

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la disfunción endotelial asociada a la inflamación
posquirúrgica.**

**La agresión asociada al acto quirúrgico provoca una disfunción
endotelial transitoria en el humano**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Gil Sales

Directores

Manuel Doblas Domínguez

Jaime Arias Pérez

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



**ESTUDIO DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL ASOCIADA A LA
INFLAMACION POSQUIRÚRGICA**

**LA AGRESIÓN ASOCIADA AL ACTO QUIRÚRGICO PROVOCA UNA DISFUNCIÓN
ENDOTELIAL TRANSITORIA EN EL HUMANO**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por
JOSÉ GIL SALES

Bajo la dirección de los doctores
MANUEL DOBLAS DOMÍNGUEZ
JAIME ARIAS PÉREZ

Madrid, 2015.

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL

La memoria “ESTUDIO DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL ASOCIADA A LA INFLAMACION POSQUIRÚRGICA. LA AGRESIÓN ASOCIADA AL ACTO QUIRÚRGICO PROVOCA UNA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL TRANSITORIA EN EL HUMANO”, presentada por D. José Gil Sales constituye, hasta la fecha, el único estudio observacional, longitudinal y prospectivo en el que se hace análisis de una posible disfunción endotelial sistémica establecida en la fase aguda que corresponde a una agresión quirúrgica mayor estudiada mediante técnicas ecográficas.

En este trabajo, de forma original, se estudia en el periodo posoperatorio inmediato la vasodilatación mediada por flujo y la influencia de las principales “citocinas proinflamatorias” con la posible disfunción endotelial que se asocia al acto quirúrgico.

Con un desarrollo claro y una metodología precisa y bien estructurada, concluye que: existe un aumento progresivo de los niveles de Interleucina 6 en las primeras veinticuatro horas que siguen a una agresión quirúrgica y que, mediante la técnica de la vasodilatación mediada por flujo de la arteria humeral, es posible valorar el desequilibrio funcional del endotelio en esas horas críticas y primigenias tras el insulto quirúrgico. Así mismo se establece que, en caso de

aparición de complicaciones tempranas, el aumento de interleucina 6 resulta potenciado.

Supone, por ello, un avance claro en el conocimiento que hoy en día tenemos acerca de la “disfunción endotelial” y de los procesos asociados al periodo posquirúrgico inmediato y contribuye, significativamente, a la construcción de la evidencia científica existente a tal efecto.

Por todo ello considero que reúne todas las condiciones necesarias para optar al Grado de Doctor con todo merecimiento.

Director de la Tesis

MANUEL DOBLAS DOMÍNGUEZ

Exjefe de servicio de Cirugía Vascular del Complejo hospitalario de Toledo. Personal emérito de las instituciones sanitarias del Servicio de Salud de Castilla-La-Mancha. D.N.I.: 50271947L.

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL

La tesis doctoral “ESTUDIO DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL ASOCIADA A LA INFLAMACION POSQUIRÚRGICA. LA AGRESIÓN ASOCIADA AL ACTO QUIRÚRGICO PROVOCA UNA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL TRANSITORIA EN EL HUMANO”, realizada por D. José Gil Sales, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del Título de Doctor, siempre que así lo considere el Tribunal designado.

Y para que conste y a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid, a 26 de octubre de dos mil quince.

Co-director de la Tesis

JAIME ARIAS PÉREZ

Catedrático de Universidad. Director del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Académico de la Real Academia Nacional de Medicina.

D.N.I.: 10539801M

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

En primer lugar, quiero transmitir mi agradecimiento a los directores de esta tesis, al Dr. Manuel Doblas Domínguez, exjefe de servicio de Cirugía Vascular del Complejo hospitalario de Toledo y personal emérito de las instituciones sanitarias del SESCOAM, quien ha sido el “jefe” que cualquiera hubiera deseado en su desarrollo profesional. Por su capacidad de empuje, por su inteligencia y sensibilidad humana, por la amplitud de conocimientos aportados y por haber sido el impulsor principal de este trabajo debo agradecer cada hora compartida.

Al profesor Jaime Arias Pérez, catedrático de la Universidad Complutense de Madrid y director del Departamento de Cirugía, co-director de este trabajo, por su cercanía, por su inestimable colaboración y consejos desde el principio, por su humanidad y su admirable caballerosidad y por su disposición constante a prestar su ayuda en todo momento.

Al profesor Mario Lachat, jefe de servicio de Cirugía Vascular del departamento de cirugía cardiovascular del Hospital universitario de Zurich, por su amistad, por los momentos pasados juntos y las charlas eternas, por su amor incondicional a la cirugía vascular y por mostrarme, con su ejemplo personal, lo que es un gran cirujano con las más altas dotes intelectuales posibles.

Al doctor José Porto Rodríguez, quien fue mi jefe de sección en mi etapa formativa como cirujano vascular y quien vuelve a ser mi admirado

“compañero” ahora en la nueva etapa en el hospital “Puerta de Hierro”. A él le debo mi formación como cirujano vascular y todas las virtudes profesionales que pueda alcanzar. Él ha significado siempre todo lo bueno en mi pasado, presente y futuro como cirujano vascular.

A mis compañeros y miembros y exmiembros del servicio de Cirugía Vascular de Toledo: Antonio Orgaz, Juan Fontcuberta, Ángel Flores, Nacho Leal, Javier Peinado, Sandra Vicente, Christian Salgado, Maria Pilar Lamarca, Ricardo Montoya, Santi Estébanez y Benito Méndez, a la secretaria Yolanda Aldarabí, a nuestras enfermeras del Laboratorio Vascular María Dolores Bermúdez y Adela Martínez, por todos estos años compartidos de grandes experiencias y trabajo y por la ayuda desinteresada en el desarrollo de muchas partes de este trabajo.

Al profesor Miguel Ángel Cuesta, catedrático de Cirugía de la Universidad de Amsterdam, por sus comentarios acertados en el inicio de este trabajo y por su revisión del documento.

Al doctor Jeroen Diks, gran cirujano vascular holandés, con quien he compartido momentos de alegría y quirófanos, por su revisión del documento aquí presentado.

A toda la enfermería de la Reanimación y plantas de Neurocirugía y Traumatología del Complejo hospitalario de Toledo, por su colaboración en la extracción de muestras para el estudio.

Al profesor Gregorio Sicard, profesor de Cirugía en la Universidad de Washington que me dio el argumento justo cuando los obstáculos parecían elevarse en los inicios de este trabajo: “Cuando las cosas se ponen difíciles no es el momento de dejar el camino, las dificultades son precisamente lo que más nos debe estimular a empezar. No dejes de hacerlo porque sea difícil. Hazlo por la misma razón”.

A los pacientes participantes, por su amabilidad, comprensión y desinteresada colaboración en este proyecto.

Y a mis padres Concha y Pepe, a mi hermano Ramon y a mi hijo Bruno, a quienes dedico este trabajo. Ellos han sido mi apoyo anímico en todo este tiempo, por su comprensión y sacrificio, por esas palabras y esos gestos creadores de la sonrisa eterna.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
SUMMARY	9
RESUME	15
ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS	25
1 INTRODUCCIÓN	29
2 REVISIÓN CRÍTICA DEL PROBLEMA.	37
2.1 REACCIÓN INFLAMATORIA EN CIRUGÍA.....	37
2.1.1 Respuesta de fase aguda.	42
2.1.2 Respuesta neuroendocrina.....	44
2.1.3 Respuesta metabólica	45
2.1.4 Respuesta inmunológica.....	46
2.2 FUNCIÓN DE LAS CITOCINAS COMO MEDIADORAS DE LA RESPUESTA	
INFLAMATORIA.....	47
2.2.1 Interleucina-1 (IL-1) y Factor de Necrosis Tumoral.....	49
2.2.2 Interleucina-6 (IL-6).....	55
2.3 INFLAMACIÓN Y ENDOTELIO.	57
2.3.1 Papel del Endotelio.....	57
2.3.2 Inflamación y función/disfunción endotelial.....	63
2.3.3 Relación entre inflamación sistémica, enfermedad cardiovascular y disfunción endotelial.	69
2.3.4 Métodos de medida de la función endotelial.	72

2.4	CONTROL DEL FLUJO SANGUÍNEO Y LA VASODILATACIÓN MEDIADA POR FLUJO EN LA CIRCULACIÓN HUMANA.	74
2.5	EVALUACIÓN NO INVASIVA DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.	76
2.5.1	La vasodilatación mediada por flujo (FMD o “flow mediated dilatation).	77
2.5.2	Valor clínico de la determinación de la vasodilatación mediada por flujo (FMD).	80
3	JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	83
4	MATERIAL Y MÉTODOS.	91
4.1	Diseño, selección y descripción de los participantes.	91
4.2	Ética y legislación.	93
4.3	Estudio de la FMD (vasodilatación mediada por flujo).	94
4.4	Medida de citocinas.	98
4.5	Estadística.	100
5	RESULTADOS	105
5.1	Características basales de los pacientes: variables categóricas.	105
5.2	Características basales de los pacientes: variables continuas.	107
5.3	Tipo de cirugía, anestesia y complicaciones posquirúrgicas.	108
5.4	Comparación de la vasodilatación mediada por flujo en porcentaje de cambio (FMD %) basal y a las 6 y 24 horas posquirúrgicas. Hipótesis principal.	109
5.5	Comparación de la FMD absoluta basal y a las 6 y 24 horas posquirúrgicas.	114
5.6	Comparación del pico de velocidad de flujo inicial (periodo preoperatorio y posquirúrgico a las 6 y a las 24 horas).	117

5.7	Comparación del pico de velocidad de flujo tras desinflado del manguito (periodo preoperatorio y posquirúrgico a las 6 y a las 24 horas).....	118
5.8	Niveles séricos de factor de necrosis tumoral (TNF) en situación basal y a las 6 y 24 horas posquirúrgicas.....	119
5.9	Niveles séricos de factor de interleucina 1 (IL-1) en situación basal y a las 6 y 24 horas posquirúrgicas.....	120
5.10	Niveles séricos de factor de interleucina 6 (IL-6) en situación basal y a las 6 y 24 horas posquirúrgicas.....	121
5.11	Relación de la vasodilatación mediada por flujo con las características basales de los pacientes.....	123
5.12	Relación de la vasodilatación mediada por flujo con las características inherentes al proceso quirúrgico.	125
5.13	Relación entre los niveles séricos de IL-6 y la presencia o no de complicaciones en el posoperatorio inmediato.	127
6	DISCUSIÓN (Y SUGERENCIAS PARA FUTUROS TRABAJOS).	129
7	CONCLUSIONES.	149
8	CONCLUSIONS.	151
9	SUGGESTIONS POUR LES TRAVAUX FUTURS.	153
10	BIBLIOGRAFÍA.	157
ANEXO A: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO.		181
ANEXO B: DOCUMENTO DE APROBACIÓN POR PARTE DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA (CEIC).		187
ANEXO C: INFORME DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN.		189

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Los mecanismos de agresión asociados al acto quirúrgico activan distintos mediadores que desencadenan una respuesta inflamatoria en el organismo a nivel local pero también sistémico. Esta inflamación resulta, en un principio, necesaria, puesto que los procesos de cicatrización dependen de ella. Sin embargo, por cuestiones intrínsecas a la agresión o al sujeto, sus efectos pueden desembocar en una respuesta exagerada y dañina para el individuo. Las citocinas, un conjunto de glucoproteínas de pequeño tamaño necesarias para la comunicación intercelular, tienen un papel fundamental en la actividad de la respuesta pro y antiinflamatoria del organismo: inducen la proliferación y diferenciación celular, la quimiotaxis, el crecimiento y la modulación de la secreción de inmunoglobulinas así como la remodelación de los tejidos. A pesar de múltiples interacciones entre ellas es posible clasificarlas en citocinas proinflamatorias, entre las que destacan por su importancia el factor de necrosis tumoral, la interleucina 1 y la interleucina 6 y, por otro lado, las citocinas antiinflamatorias, que intentan detener los procesos activados por las primeras. El endotelio, por otro lado, puede considerarse un órgano de pleno derecho a pesar de su amplio destierro histórico en el ámbito de la fisiopatología médica hasta fechas relativamente recientes. Esto se debe a su vital localización en la interfaz entre los elementos circulantes de la sangre y el resto de los tejidos y a sus múltiples funciones entre las que destacan la regulación del flujo de sustratos al espacio extravascular, el control de la coagulación, el tono vascular y la fibrinólisis y la activación leucocitaria. Funciones que son fundamentales al proceso inflamatorio e interrelacionado

con la activación de las citocinas proinflamatorias. El profundo estudio de este dinámico proceso, extremadamente complejo e insuficientemente conocido es de gran utilidad a la hora de minimizar los efectos deletéreos ligados a una pérdida excesiva de la homeostasis tras la cirugía. En condiciones fisiológicas normales el óxido nítrico, sustancia vasodilatadora principal producida por las células endoteliales, juega un papel fundamental a la hora de mantener un estado quiescente en la pared vascular a través de la inhibición de la inflamación, de la trombosis y de la proliferación celular. Hablamos de disfunción endotelial ante cualquier condición que implique una actividad anormal del endotelio ya sea por activación exagerada o deterioro de sus funciones como por pérdida real de integridad endotelial. Lo más característico de este estado disfuncionante es un deterioro de la biodisponibilidad de óxido nítrico a causa de la reducción de la producción de éste por la sintasa de óxido nítrico endotelial y/o por el aumento de la degradación del óxido nítrico por las especies reactivas de oxígeno. La fuerza de cizallamiento tangencial es un factor activador clave de esta enzima en circunstancias fisiológicas y es evidente el hecho de que una alteración patológica del endotelio redundará, tras aplicación de dicha fuerza, en una menor producción de óxido nítrico y, por tanto, en una menor vasodilatación asociada. Este fenómeno fisiológico es la base de uno de los métodos más extendidos en el campo de la investigación para la evaluación de la función endotelial: la vasodilatación mediada por flujo en la arteria humeral. Se trata de un método no invasivo que por sus amplias ventajas se ha convertido en la técnica más utilizada en el estudio de la función endotelial en las enfermedades cardiovasculares. La alteración de la función endotelial precede al establecimiento de los cambios morfológicos observados

en la aterosclerosis y si bien la vasodilatación mediada por flujo ha sufrido un progresivo prestigio como instrumento con capacidad pronóstica de los riesgos cardiovasculares individuales, no existen estudios que investiguen su aplicación en el análisis en fase aguda de una posible disfunción endotelial sistémica tras una agresión de naturaleza quirúrgica.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS: La hipótesis conceptual es que existe un proceso agresivo (inflamatorio) asociado al acto quirúrgico que distorsiona la función endotelial del tono vascular en la circulación arterial en las horas siguientes a la cirugía. La hipótesis operacional: existe un proceso agresivo asociado al acto quirúrgico que distorsiona la función endotelial del tono vascular en la circulación arterial determinada mediante la técnica de vasodilatación mediada por flujo (FMD) en las primeras 24 horas. La hipótesis estadística: la hipótesis nula es que la agresión asociada al acto quirúrgico no provoca diferencias en la vasodilatación mediada por flujo (FMD expresada en porcentaje de cambio) en las primeras veinticuatro horas. Para establecer la hipótesis alternativa, dada la escasa evidencia científica sobre la modificación en la FMD, no se pudo utilizar ninguna cifra previamente publicada. Se asumió, como razonable, que la FMD disminuiría el 5% a las 6 horas de la cirugía. Por lo tanto, se estableció como hipótesis alternativa que, en los pacientes que son sometidos a cirugía, la FMD disminuye, al menos, un 5%. Otros objetivos del estudio son analizar la influencia de las principales citocinas proinflamatorias con la disfunción endotelial asociada al acto quirúrgico mediante análisis de sus variaciones en el postoperatorio inmediato y valorar la existencia de características inherentes a los pacientes o al proceso quirúrgico que conlleven una mayor disfunción

endotelial en el posoperatorio inmediato, entendida ésta como un mayor deterioro de la vasodilatación mediada por flujo.

MÉTODOS: Se trata de un estudio observacional, longitudinal y prospectivo. Tras cálculo del tamaño muestral necesario, partiendo de la hipótesis estadística, se realizó un muestreo de casos consecutivos entre los pacientes sometidos a una intervención de tipo traumatológico (reparación de fracturas, laminectomías, etc.) hasta completar un número total de 41 pacientes. Se entregó consentimiento informado por escrito a los pacientes y el estudio contó con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Complejo hospitalario de Toledo. Las exploraciones ecográficas para la determinación de la vasodilatación mediada por flujo fueron realizadas mediante un ecógrafo de alta gama y software avanzado vascular y una sonda multifrecuencia de 7 a 14 megahertzios. Además, se procedió a análisis de los valores séricos de citocinas. Mediante técnica de enzimoimmunoanálisis se determinaron los niveles de interleucina 1 y factor de necrosis tumoral y mediante técnica de inmunoluminiscencia los valores de interleucina 6. Las mediciones de la vasodilatación mediada por flujo y de las citocinas se realizaron en tres ocasiones: periodo preoperatorio, a las seis y a las veinticuatro horas de la intervención quirúrgica. Se usó el programa EPIDAT 4.1 para el cálculo del tamaño muestral y el paquete estadístico SPSS 19.0 bajo licencia de IBM para el resto de análisis estadístico realizando, en la mayoría de análisis, el test de Friedman para muestras relacionadas sin distribución normal para el ANOVA de dos factores por rangos. Para realizar la comparación entre grupos se utilizó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas.

RESULTADOS: Se observó una disminución evidente de la vasodilatación mediada por flujo en porcentaje de cambio a las seis horas tras la intervención quirúrgica con una diferencia media de 9,33 puntos estadísticamente significativa. Posteriormente, a las veinticuatro horas, existió una recuperación de los valores hasta alcanzar cifras similares a las basales desde las que partían los pacientes antes de ser intervenidos. Esto significa el cumplimiento de la hipótesis principal del trabajo que es la existencia de una disfunción endotelial asociada al acto quirúrgico, transitoria, en las primeras horas tras la intervención. Los mismos resultados se obtuvieron para la vasodilatación mediada por flujo en cambio absoluto. Con respecto a los niveles de citocinas séricas, no se observaron cambios significativos en los valores del factor de necrosis tumoral si exceptuamos una disminución mínima pero significativa estadísticamente de dichos niveles entre las seis y las veinticuatro horas tras la cirugía. Por el contrario sí existió un descenso de los niveles de interleucina 1 a las seis horas del procedimiento estadísticamente significativo con recuperación a niveles basales a las veinticuatro horas. Los niveles de interleucina 6 sufrieron una elevación progresiva en sus concentraciones en sangre hasta alcanzar niveles máximos a las veinticuatro horas posoperatorias.

DISCUSIÓN: Aunque la vasodilatación mediada por flujo es una técnica pronóstica y de investigación con múltiples estudios en el campo de la patología cardiovascular o de la sepsis, resultan anecdóticos los trabajos sobre pacientes quirúrgicos que la hayan empleado. En ellos siempre se ha utilizado como instrumento con valor pronóstico de la evolución posterior del paciente a

las semanas de la intervención y no existen exámenes que centren su utilización en una valoración de la función del endotelio en las horas que siguen a una intervención quirúrgica. En nuestro estudio observamos que realmente sí existe una disfunción del endotelio en los pacientes sometidos a una intervención quirúrgica en las primeras horas del posoperatorio independientemente de las características basales o inherentes al estímulo que únicamente podrán modificar en mayor o menor grado esa disfunción inexcusable. A las veinticuatro horas observamos, en cambio, una vuelta a la normalidad con respecto a la funcionalidad de dicho endotelio. Resulta, fundamental, de todos modos, realizar una técnica de valoración de la vasodilatación mediada por flujo conforme a protocolos aceptados y con base evidente en estudios fisiológicos del fenómeno que la produce. Con respecto a las citocinas, la reacción inicial al iniciarse la respuesta inflamatoria a la agresión quirúrgica es un aumento de la producción de factor de necrosis tumoral e interleucina 1, pero estas sustancias tienen una vida media muy corta y los intentos de detección a las horas de la cirugía o incluso dentro de la primera hora del estímulo no aportan datos contundentes y, por sus características biológicas, no parece que se trate de sustancias cuyo estudio resulte rentable en el periodo posoperatorio de los pacientes. Los niveles séricos de interleucina 6, en cambio, se mantienen en progresivo aumento durante el posoperatorio inmediato, se trata de una sustancia proinflamatoria que acaba inhibiendo la producción de las otras citocinas proinflamatorias y que inicia la respuesta de fase aguda a nivel sistémico. Además, existe una relación clara y estadísticamente significativa en la que se observa que valores

mayores de esta citocina en el periodo posquirúrgico inmediato se asocian a una mayor probabilidad de complicaciones en ese periodo.

CONCLUSIONES: Por su naturaleza no invasiva, la presencia de los instrumentos necesarios en la mayoría de hospitales y el valor de la técnica para valorar la función endotelial, la técnica de la vasodilatación mediada por flujo permite su aplicación en un amplio número de pacientes en los que se quiera valorar el equilibrio funcional del endotelio. La agresión asociada al acto quirúrgico provoca una disfunción endotelial transitoria en el humano en las horas siguientes a la cirugía que podemos medir mediante esta técnica. Existe un aumento progresivo de los niveles séricos de interleucina 6 en las primeras veinticuatro horas del posoperatorio en los pacientes sometidos a una intervención quirúrgica. La presencia de complicaciones en el posoperatorio inmediato se asocia, de forma estadísticamente significativa, a una mayor concentración sérica de interleucina 6 a las seis y a las veinticuatro horas de la cirugía.

DESCRIPTORES:

Óxido Nítrico, Endotelio Vascular, Vasodilatación, Interleucina-6, Interleucina-1, Factor de Necrosis Tumoral alfa, /cirugía, Inflamación

SUMMARY

INTRODUCTION: The mechanisms of aggression associated with surgery activate various mediators that trigger an inflammatory response in the body at the local but also at systemic level. This inflammation is, in principle, necessary, since the healing process, ultimately, depend on it. However, for reasons that depend on assault or patient condition, the effects can lead to an exaggerated response harmful to the individual. Cytokines, a set of small glycoproteins necessary in intercellular communication, play a fundamental role in the activity of the pro and anti-inflammatory response of the organism: they induce cell proliferation and differentiation, chemotaxis, modulate immunoglobulin secretion and tissue remodeling. Although there are multiple interactions between them, we may classify them into proinflammatory cytokines, the most important of which are tumor necrosis factor, interleukin 1 and interleukin 6 and, on the other hand, anti-inflammatory cytokines, attempting to stop the activated processes for the former. Furthermore, the endothelium can be considered a full body organ despite its broad historical exile in the field of medical pathophysiology until relatively recently. This importance is due to its location in the vital interface between circulating blood elements and other tissues and its multiple functions among which regulating the flow of substrates into the extravascular space, control of coagulation, vascular tone and fibrinolysis and leukocyte activation. Functions that are critical to the inflammatory response and interrelated with the activation of proinflammatory cytokines. The deep study of this dynamic process, extremely complex and poorly understood is very useful in minimizing the deleterious effects associated with an excessive loss of

homeostasis after surgery. Under normal physiological conditions nitric oxide, the main vasodilator substance produced by endothelial cells, plays a key role in maintaining a quiescent state in the vascular wall through inhibition of inflammation, thrombosis and cell proliferation. When we speak about endothelial dysfunction we describe any condition that involves abnormal activity of endothelial activation either exaggerated or deterioration of their core functions as actual loss of endothelial integrity. The most characteristic feature of this dysfunctional state is an impaired nitric oxide bioavailability due to reduced production by the endothelial nitric oxide synthase and / or increased degradation of nitric oxide by reactive oxygen species. Shear stress is a key factor, in physiological circumstances, in increasing the nitric oxide production and it is obvious that a pathological alteration of the endothelium results, after applying this shear stress, in a lower production of nitric oxide and thus a lower vasodilation associated. This physiological phenomenon is the basis of one of the most widespread methods used in research for the evaluation of endothelial function: flow-mediated vasodilation in the brachial artery. It is a non-invasive method and for its extensive benefits it has become the most used method in the study of endothelial function in cardiovascular disease. The alteration of endothelial function precedes the establishment of the morphological changes observed in atherosclerosis and although the flow mediated vasodilation has suffered a progressive reputation as a prognostic instrument of individual cardiovascular risk, no studies have investigated its application to analyse a possible systemic endothelial dysfunction during the early postoperative period.

RESEARCH QUESTIONS, HYPOTHESES AND OBJECTIVES: The conceptual hypothesis is that there is an aggressive process (inflammatory) associated with surgery that distorts the tone of vascular endothelial function in blood circulation in the hours following surgery. Operational hypothesis: There is an aggressive process (inflammatory) associated with the surgery that distorts the endothelial function of vascular tone (arterial circulation) using the technique of flow-mediated vasodilation (FMD) in the first 24 hours. The statistical hypotheses: the null hypothesis is that aggression associated with surgery does not cause differences in flow-mediated vasodilation (FMD expressed in percent change) in the first twenty-four hours after surgery. To set the alternative hypothesis, given the limited scientific evidence on the change in flow mediated vasodilation could not use any previously published figure. It was assumed, as reasonable, a decrease of 5% in flow mediated vasodilation at 6 hours after surgery. Therefore, it was established as an alternative hypothesis that in patients who are undergoing surgery, the flow mediated vasodilation decreases at least 5%. Other objectives of the study are to analyze the influence of the main proinflammatory cytokines in endothelial dysfunction associated with surgery by analyzing variations in serum concentrations in the immediate postoperative period and assess the existence of inherent characteristics of the patients or the surgical process involving increased endothelial dysfunction in the immediate postoperative period.

METHODS: This is an observational, longitudinal and prospective study. After the sample size necessary has been calculated, based on the statistical hypothesis, consecutive case sampling was conducted among patients

undergoing traumatological interventions (fracture repair, laminectomy, etc.) making up a total number of 41 patients. They also received informed consent and the study had the approval of the Ethics Committee of the Hospital of Toledo. Ultrasound scans to determine the flow mediated vasodilation were performed using a high-end ultrasound and vascular advanced software and a probe multifrequency of 7-14 megahertz. In addition, we proceeded to analysis of serum cytokine levels. By enzyme immunoassay technique levels of interleukin 1 and tumor necrosis factor were determined and by immunofluorescence technique the values of interleukin 6. The measurements of flow-mediated vasodilation and cytokines were performed on three occasions: preoperative period, and six and twenty four hours after surgery. We use 4.1 EPIDAT program for calculating the sample size and the statistical package SPSS 19.0 licensed by IBM for the rest of statistical analysis. For most of our analyses the Friedman test for repeated measures analysis of variance by ranks has been employed. For comparison between groups the Wilcoxon signed-rank test ranges has been used.

RESULTS: a decrease in the flow mediated vasodilation, expressed as the change in percentage, six hours after surgery with a mean difference of 9.33 points was observed statistically significant. Later, at twenty-four hours, there was a recovery of values to achieve similar figures to baseline levels from patients before surgery. These facts support the main hypothesis of this study: the existence of an endothelial dysfunction associated with surgery, of transitory nature, in the hours after surgery. The same results were obtained for the flow mediated vasodilatation reporting absolute change. With respect to serum

levels of cytokines, no significant changes were observed in the values of tumor necrosis factor excepting minimal but statistically significant decrease in these levels between six and twenty-four hours after surgery. As far as interleukin-1 was concerned, it was a decrease in the levels of interleukin-1 at six hours and a statistically significant recovery to basal levels at twenty-four hours after surgery. Levels of interleukin 6 suffered a progressive increase in their blood concentrations reaching peak levels at twenty-four hours postoperatives.

DISCUSSION: Although the flow mediated dilation is a prognostic research technique with multiple studies in the field of cardiovascular disease or sepsis, its use on surgical patients are anecdotal. In these cases, it have been always used as a tool with prognostic value of the subsequent evolution of the patient in the weeks ahead after surgery and there are no tests that focus their use on an assessment of endothelial function in the hours following surgery. In our study we observed that really an endothelial dysfunction exists in patients undergoing surgery in the early postoperative time regardless of baseline characteristics of the patient or the stimulus which can only change to a greater or lesser degree this inexcusable dysfunction. Twenty-four hours after surgery we observe, however, the return to the normal value with respect to the functionality of the endothelium. It is of paramount importance, however, to make a technical assessment of flow-mediated vasodilation in accordance with accepted protocols and based on evident physiological studies of the phenomenon. With respect to cytokines, the initial reaction to begin the inflammatory response to surgical aggression is an increased production of tumor necrosis factor and interleukin-1, but these substances have a very short

half lives and detection attempts to hours after surgery or even within the first hour of stimulation does not provide convincing data and, because their biological characteristics, it appears that a measurement of these substances in the postoperative period of patients is unprofitable. Serum levels of interleukin 6, however, remain in progressive increase during the immediate postoperative period, it is just a proinflammatory substance that inhibits other proinflammatory cytokines production and it will be responsible for initiating the acute phase response systemically. In addition, there is a clear and statistically significant relationship in which larger values of this cytokine in the immediate postoperative period is associated with a greater likelihood of complications during this period.

CONCLUSIONS: Because of its noninvasive nature, the presence of the necessary tools in most hospitals and the value of the technique to assess endothelial function, the technique of flow-mediated vasodilation allows its application in a large number of patients to assess the functional balance of the endothelium. The aggression associated with surgery causes a transient endothelial dysfunction in humans in the hours following surgery that can be measured by this technique. There is a progressive increase in serum levels of interleukin-6 in the first twenty-four hours postoperatively in patients undergoing surgery. The presence of complications in the immediate postoperative period is associated, statistically significantly, to greater serum interleukin 6 level at six and twenty four hours after surgery.

DESCRIPTORS

Nitric Oxide, Endothelium, Vascular, Vasodilation, Interleukin-6, Interleukin-1, Tumor Necrosis Factor-alpha, /surgery, Inflammation

RESUME

INTRODUCTION: Les mécanismes d'agression associés à la chirurgie activent différents médiateurs qui déclenchent une réponse inflammatoire dans le corps au niveau local mais aussi systémique. Cette inflammation est, en principe, nécessaire, étant donné que le processus de guérison en dépend. Cependant, par des questions relevant des caractéristiques intrinsèques à l'agression ou aux sujets, les effets peuvent conduire à une réponse exagérée et défavorable pour l'individu. Les cytokines, un ensemble de petites glycoprotéines qui servent à la communication intercellulaire, jouent un rôle fondamental dans l'activité de la réponse pro et anti-inflammatoire de l'organisme en activant la prolifération et la différenciation cellulaire, la chimiotaxie, la croissance et la modulation de la sécrétion des immunoglobulines et le remodelage tissulaire. Malgré leurs nombreuses interactions, il est possible de les classer en cytokines pro-inflammatoires, parmi lesquels le facteur de nécrose tumorale, l'interleukine 6 et l'interleukine 1 sont les plus importantes, et, d'autre part, en cytokines anti-inflammatoires, qui tentent d'arrêter les processus activés pour le premier groupe. D'un autre côté, l'endothélium, peut être considéré comme un organe à part entière, malgré que cette structure a souffert d'un manque de considération dans le domaine de la physiopathologie médicale pendant de nombreuses années jusqu'à nos jours. Cette importance biologique est due à son emplacement dans l'interface vitale entre les éléments circulants dans le sang et la reste des tissus et, en plus, à toutes ses fonctions parmi lesquelles la régulation du débit de substrats dans l'espace extravasculaire, le contrôle de la coagulation, du tonus vasculaire et de

la fibrinolyse et l'activation des leucocytes. Des fonctions qui sont essentielles à la réponse inflammatoire et intimement liées à l'activation des cytokines pro-inflammatoires. L'étude approfondie de ce processus dynamique, extrêmement complexe et assez mal compris est très utile pour minimiser les effets délétères associés à la perte excessive de l'homéostasie après la chirurgie. Dans des conditions physiologiques normales, l'oxyde nitrique, la principale substance vasodilatatrice produite par les cellules endothéliales, joue un rôle clé dans le maintien d'un état de repos dans la paroi vasculaire par inhibition de l'inflammation, de la thrombose et de la prolifération cellulaire. Nous parlons de "dysfonction endothéliale" devant toute condition qui implique une activité anormale de l'activation endothéliale soit parce qu'elle se révèle exagérée, soit parce qu'il existe une claire détérioration de leurs fonctions ou la perte réelle de l'intégrité endothéliale. La chose la plus caractéristique de cet état dysfonctionnel est une altération de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique en raison d'une diminution de la production de celui-ci par l'oxyde nitrique synthase endothéliale et / ou par une augmentation de la dégradation de l'oxyde nitrique par les espèces réactives de l'oxygène. La force de cisaillement est définie comme la force tangentielle provenant du frottement du sang qui coule sur la surface endothéliale de la paroi des artères. Cette force est un facteur d'activation fondamentale de l'oxyde nitrique synthase endothéliale dans des conditions physiologiques. Il est évident qu'une altération pathologique de l'endothélium, malgré l'application de ladite force, produira une baisse de la production d'oxyde nitrique et donc une vasodilatation inférieure associée. Ce phénomène physiologique est la base de l'un des plus répandus méthodes dans le domaine de la recherche pour l'évaluation de la fonction endothéliale: la

vasodilatation médiée par le flux dans l'artère brachiale. Il est une méthode non-invasive qui, par ses vastes avantages, est devenue la technique la plus utilisée dans l'étude de la fonction endothéliale dans les maladies cardiovasculaires. L'altération de la fonction endothéliale précède les modifications morphologiques observées dans l'athérosclérose et bien que la vasodilatation médiée par le flux a subi une réputation progressive comme un instrument pronostique du risque cardiovasculaire individuel, il n'existe pas d'études qui analysent son application dans la recherche d'une éventuelle dysfonction endothéliale systémique lors de la phase aiguë du suivi postopératoire.

HYPOTHESES ET OBJECTIFS: L'hypothèse conceptuelle est qu'il y a un processus agressif (inflammatoire) associée à la chirurgie qui perturbe la fonction endothéliale responsable du tonus vasculaire dans la circulation artérielle dans les heures qui suivent la chirurgie. Hypothèse opérationnelle: Il y a un processus agressif (inflammatoire) associée à la chirurgie qui déforme la fonction endothéliale du tonus vasculaire en particulier dans la circulation artérielle déterminée celle-ci en utilisant la technique de la vasodilatation médiée par le flux dans les premières vingt-quatre heures. Les hypothèses statistiques: l'hypothèse nulle est que l'agression associée à la chirurgie ne provoque pas de différences dans la vasodilatation médiée par le flux (exprimée avec le pourcentage de variation) dans les premières vingt-quatre heures. Pour définir l'hypothèse alternative, étant donné le peu de données scientifiques sur le changement de la vasodilatation médiée par le flux et ne pouvant pas utiliser des chiffres précédemment publiés, on a supposé de façon raisonnable, que dans le cas d'existence d'une descente de 5% de la

vasodilatation médiée par le flux à 6 heures après la chirurgie, on aura des conséquences vraiment significatives. Par conséquent, il a été établi comme hypothèse alternative que chez les patients qui subissent une chirurgie, la vasodilatation médiée par le flux diminue d'au moins un 5%. Les autres objectifs de ce travail sont: analyser l'influence des principales cytokines pro-inflammatoires dans le dysfonctionnement endothélial associé à la chirurgie en analysant les variations de celles-ci dans la période postopératoire immédiate et évaluer la possible existence de caractéristiques inhérentes aux patients ou au processus chirurgical qui implique une dysfonction endothéliale majeur dans la période postopératoire immédiate (analyse statistique pour comparer les différences de valeurs de vasodilatation médiée par le flux entre différents groupes).

MÉTHODES: Ceci est une étude observationnelle, longitudinale et prospective. Après le calcul de la taille de l'échantillon nécessaire, sur la base de l'hypothèse statistique, l'échantillonnage a été réalisé sur une population consécutive de malades parmi les patients subissant une chirurgie traumatologique (réparation de fracture, laminectomie, etc.) jusqu'à compléter un nombre total de 41 patients. Un consentement éclairé par écrit du patient pour la participation dans l'étude a été obtenu et on avait l'approbation du comité d'éthique clinique de l'Hôpital Universitaire de Toledo (Espagne). Les échographies Doppler pour déterminer la juste valeur de la vasodilatation médiée par le flux on été effectuées à l'aide d'un appareil d'échographie haut de gamme avec un logiciel avancé pour les études vasculaires et une sonde à ultrasons multifréquence à 7-14 mégahertz. En outre, on a procédé à l'analyse

des niveaux des cytokines dans le sérum. Les dosages de l'interleukine 1 et du facteur de nécrose tumorale ont été déterminés par épreuves d'immuno-absorption enzymatique et ceux d'interleukine 6 avec technique d'immunofluorescence. Les mesures de cytokines et de la vasodilatation médiée par le flux ont été effectuées à trois reprises: la période pré-opératoire, et après la chirurgie dans les six et dans les vingt-quatre heures suivantes. Nous avons utilisé le programme EPIDAT 4.1 pour le calcul de la taille de l'échantillon et le progiciel de statistiques SPSS 19,0 sous licence par IBM pour le reste de l'analyse statistique faisant surtout des tests de Friedman sur trois échantillons appariés. Pour réaliser la comparaison entre les groupes le test de Wilcoxon au cas de deux échantillons associées par paires a été le plus utilisé.

RESULTATS: Les résultats qui ont pu être observés sont, premièrement une évidente diminution de la vasodilatation médiée par le flux (exprimé dans le pourcentage de variation) six heures après l'intervention chirurgicale avec une différence moyenne de 9,33 qui est statistiquement significative. Plus tard, on assiste, vingt-quatre heures après l'intervention, à une reprise des valeurs de base avec des chiffres similaires à celles-ci du départ des patients avant la chirurgie. Cela signifie l'accomplissement de la principale hypothèse de ce travail, c'est à dire, l'existence d'un dysfonctionnement endothélial associée à la chirurgie, transitoire, dans les heures qui suivent l'intervention. Les mêmes résultats ont été obtenus pour la vasodilatation médiée par le flux exprimé comme changement absolu. En ce qui concerne les niveaux de cytokines dans le sérum, aucune modification significative n'a été observée dans les valeurs du facteur de nécrose tumorale à exception d'une diminution minimale et

progressive pendant la période postopératoire. Les niveaux d'interleukine 1 subissent une diminution claire six heures après la procédure avec une récupération statistiquement significative à des niveaux de base dans les vingt-quatre heures suivantes. Les niveaux d'interleukine 6 ont subi une augmentation progressive de leurs concentrations sanguines atteignant des niveaux maximaux vingt-quatre heures après la chirurgie.

DISCUSSION: Bien que la vasodilatation médiée par le flux est une technique de recherche pronostique et avec plusieurs études développées dans le domaine des maladies cardio-vasculaires ou de la septicémie, les travaux qui l'ont utilisée sur les patients chirurgicaux sont vraiment anecdotiques et, dans tous les cas, cette technique a toujours été utilisé comme un outil à valeur pronostique de l'évolution ultérieure du patient au cours des semaines après la chirurgie et il n'y a pas de travaux qui concentrent leur attention sur l'utilisation de la technique pour évaluer la fonction endothéliale dans les heures suivant la chirurgie. Dans notre étude, nous avons observé qu'il existe vraiment une dysfonction endothéliale chez les patients subissant une chirurgie dans le postopératoire précoce indépendamment des caractéristiques basales de l'individu ou inhérentes au stimulus, et celles-ci ne peuvent que modifier plus ou moins ce dysfonctionnement qui est tout à fait inexcusable. Vingt-quatre heures après la chirurgie, on observe, cependant, un retour à la valeur normale par rapport à la fonctionnalité de l'endothélium. Il est fondamental, toutefois, de faire une évaluation technique de la vasodilatation médiée par le flux conformément aux protocoles acceptés et basée sur des études physiologiques du phénomène qui la produit. En ce qui concerne les cytokines, la réaction

initiale pour commencer la réponse inflammatoire à une agression chirurgicale est une augmentation de la production de l'interleukine-1 et du facteur de nécrose tumorale, mais ces substances ont une très courte demi-vie et les tentatives de détection dans les heures qui suivent la chirurgie ou même au sein de la première heure de la stimulation ne fournissent pas de données convaincantes et, par leurs caractéristiques biologiques, il semble que la détermination de ces substances dans la période postopératoire des patients sera peu rentable. Les niveaux sériques d'interleukine 6, cependant, restent en augmentation progressive au cours de la période postopératoire immédiate. Il s'agit d'une substance pro-inflammatoire qui inhibe la production d'autres cytokines pro-inflammatoires et qui est responsable d'initier la réponse de phase aiguë systémique. En outre, il y a une relation claire et statistiquement significative dans laquelle les plus grandes valeurs de cette cytokine dans la période post-opératoire immédiate sont associées à une plus grande probabilité de complications au cours de cette période.

CONCLUSIONS: En raison de sa nature non invasive, la présence des outils nécessaires dans la plupart des hôpitaux et de la valeur de la technique pour évaluer la fonction endothéliale, la technique de la vasodilatation médiée par le flux permet son application dans un grand nombre de patients afin d'évaluer l'équilibre fonctionnel de l'endothélium. L'agression associée à la procédure chirurgicale entraîne une dysfonction endothéliale transitoire chez l'homme dans les heures qui suivent une intervention chirurgicale qui peut être mesurée par la technique de la vasodilatation médiée par le flux. Il y a une augmentation progressive des niveaux sériques d'interleukine-6 dans les premières vingt-

quatre heures après l'opération chez les patients subissant une chirurgie. La présence de complications dans la période post-opératoire immédiate est associée, de façon statistiquement significative, à des niveaux sériques plus élevés d'interleukine-6 dans les six et vingt-quatre heures suivant la chirurgie.

MOTS-CLES

Oxide Nitrique, Endothélium, Vasculaire, Vasodilatation, Interleukine-6, Interleukine-1, Facteur de Nécrose Tumorale-alpha, /chirurgie, Inflammation

“La inflamación es el principio de la Cirugía”

John Hunter.

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADP	Adenosín difosfato
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial constitutiva
ET	Endotelina
FMD	Vasodilatación mediada por flujo (Flow Mediated Dilatation)
HLA	Antígeno leucocitario humano
IECAs	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
mg	miligramos
NADPH	Nicotamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
PAF	Factor activador de la plaqueta
PCR	Proteína C reactiva
pg	picogramos
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaciclina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral (alfa)

**ESTUDIO DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL
ASOCIADA A LA INFLAMACION
POSQUIRÚRGICA**

**LA AGRESIÓN ASOCIADA AL ACTO QUIRÚRGICO PROVOCA UNA
DISFUNCIÓN ENDOTELIAL TRANSITORIA EN EL HUMANO**

1 INTRODUCCIÓN

El término *inflamación* hace referencia a la compleja respuesta biológica a una lesión de cualquier origen que se desarrolla en los tejidos vascularizados del organismo. Esta serie de fenómenos locales que se desarrollan tras una agresión intentan restaurar la salud previa del organismo y son los que permiten la curación de las heridas. La *paradoja* de la Cirugía: herir para curar, únicamente puede resolverse dando por supuesto la existencia de mecanismos biológicos que conducirán a la reparación de las “heridas” operatorias, por lo que, en último término, la resolución de la *paradoja* exige siempre una INFLAMACIÓN como respuesta. A través de reacciones de tipo vascular, humoral, celular y nervioso, la inflamación se encarga de reparar los trastornos producidos por los más variados agentes con la finalidad de prolongar la integridad de los órganos¹.

En la historia de la Cirugía, este cambio de paradigma, en el que la inflamación deja de ser un proceso morboso definido por los cuatro signos clásicos de Celso (rubor, dolor, tumefacción y calor) para convertirse en un mecanismo de defensa, fue introducido por primera vez por John Hunter y permitió el ulterior desarrollo de la cirugía científica y experimental. Hunter fue de los primeros en convencerse de la necesidad de análisis y de experimentación de los síntomas variables que produce la inflamación en los diferentes tejidos, consagrando más de treinta años a la investigación sobre

este tema e influyendo, de modo decisivo, en los sucesivos trabajos de los próceres de la ciencia quirúrgica.

No en vano, según refiere Theodor Billroth en su libro capital *Die allgemeine chirurgische Pathologie und Therapie: in funfzig Vorlesungen*² (Tratado de patología y terapéutica quirúrgica en cincuenta lecciones, Berlin, 1882), otro insigne cirujano, el inglés sir Astley Cooper, inauguraba sus lecciones de Cirugía con las siguientes palabras: “El tema de nuestra lección de hoy es la irritación (inflamación), que debéis considerar como la base de la cirugía como ciencia. ¡Estudiadla desde un principio con detenimiento y conocedla con la mayor claridad posible. Sin su conocimiento jamás conoceréis los principios de vuestro arte ni seréis capaces de aportar beneficios, en el ejercicio de vuestra profesión, a aquellos que confían en vuestro tratamiento!”.

El endotelio, por otra lado, es un monocapa de células que recubre y forma la parte más interna de todos los vasos del organismo. Las células que lo forman, llamadas células endoteliales, gozan de un papel esencial en el control de múltiples procesos fundamentales a la homeostasis: regulación del tráfico celular y macromolecular, mantenimiento de la fluidez sanguínea, angiogénesis, gobierno del tono vasomotor, entre otros. Se trata, pues, de un *órgano* de pleno derecho evidente, a pesar de la falta de consideración desde tiempos inmemoriales por parte de la Medicina. Y todavía en la actualidad, a pesar de su fundamental papel y de una localización tan decisiva en la interfaz entre los elementos circulantes de la sangre y la pared vascular, la enseñanza y la concepción fisiopatológica médica esquiva su adecuada apreciación. La

práctica totalidad del progreso científico en este campo proviene de estudios experimentales realizados en las últimas dos décadas. El reconocimiento de su importancia y el estudio de su complejidad nos permitiría, sin duda, avances trascendentales en el campo de la biología y de la medicina en particular.

El endotelio participa activamente en la defensa del organismo contra los agentes patógenos reclutando a los leucocitos del corriente circulatorio hacia los focos de infección, liberando mediadores inflamatorios y favoreciendo localmente la coagulación, para evitar así la difusión hematógena de la infección. No obstante, esta respuesta focal y adaptada puede generalizarse, amplificarse, por ejemplo durante una sepsis, y provocar daños tisulares. Ante la imposibilidad de retorno a una situación basal hablamos de un endotelio disfuncional.

La disfunción endotelial se caracteriza por cambios en la actividad normal del endotelio. Es un estadio patológico que podemos considerar *sistémico* definido generalmente como un desequilibrio entre sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras con origen o diana endotelial, puesto que la función del tono vasomotor se encuentra siempre afectada en caso de disfunción de este órgano. Algunos estudios han demostrado que la inyección de lipopolisacáridos de la membrana de bacterias Gram negativas³⁻⁵, tanto en animales como en humanos, induce un desprendimiento de las células endoteliales de la membrana basal y un edema subendotelial. Los mediadores inflamatorios liberados por los leucocitos y también por las mismas células endoteliales (factor de necrosis tumoral alfa o $\text{TNF}\alpha$, Interleucina 1 o IL-1, interferón,

radicales libres del oxígeno y la hipoxia) aceleran el paso a apoptosis de las células endoteliales⁶⁻⁸. La producción de óxido nítrico (NO) y de prostaciclina (PGI₂) por las células endoteliales también se encuentra alterada en los procesos inflamatorios. Y puesto que estas moléculas controlan, no solamente el tono vascular, sino también la producción de t-PA y la adhesión leucoplaquetaria, la disminución de su liberación favorece la adhesión y la agregación leucoplaquetaria y la activación de la coagulación^{9,10}. En último término, también, la exposición de las células endoteliales a citocinas proinflamatorias provoca la expresión en la superficie celular de moléculas de adhesión y disminuye la relajación vascular dependiente del endotelio.¹¹

Parece, por tanto, patente, que los múltiples procesos inflamatorios conocidos como el traumatismo o la infección alteran el funcionamiento y la estructura del endotelio. ¿Pero cuáles son los eslabones químicos entre el proceso inflamatorio y la disfunción endotelial? La estrecha relación entre la proteína C reactiva (PCR) y la función endotelial sugiere que, *per se*, dicha proteína puede interactuar con las células endoteliales. Pero la PCR es un marcador sustituto “distal” de varias citocinas proinflamatorias, las cuales también pueden afectar a la función endotelial. Entre ellas, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Diversas evidencias sugieren que esta citocina juega un papel principal en la disfunción endotelial: Bhagat y Vallance¹² muestran que, mientras la infusión de TNF- α y la de IL-1 deterioran la función endotelial en sujetos sanos, la infusión de Interleucina 6 (IL-6) no la modifica. Además varios trabajos^{12,13} ya demostraron de que la administración de TNF- α deprime la relajación dependiente del endotelio *in vivo* y más recientemente, en

experimentos con cultivos celulares^{14,15}, se demuestra que el TNF reduce la vida media del ARNm que codifica la sintasa de óxido nítrico, enzima productora de óxido nítrico, a su vez sustancia vasodilatadora de gran potencia. La importancia de revelar el papel exacto del TNF en la disfunción endotelial radica no únicamente en la capacidad de desenredar la fisiopatología del proceso, sino además en el hecho de que actualmente somos capaces de usar terapias anti-TNF como el etanercept¹⁶ que permitirían abortar o controlar dicho proceso. Y, por tanto, nos permitiría el uso de nuevas estrategias terapéuticas en diversos tipos de pacientes con disfunción endotelial establecida de manera breve o prolongada como son los enfermos renales, los cardiovasculares de riesgo, los pacientes quirúrgicos, etc.

Un endotelio INTACTO es, por lo tanto, crucial para la vasodilatación mediada por el flujo en las arterias de conducción y la alteración de las células endoteliales por procesos inflamatorios será capaz de modificar dicha dilatación en función de la agresión actuante y del estado basal “endotelial”, o sea de la reserva funcional endotelial del sujeto.

En los últimos años un interés creciente de caracterizar funcionalmente el endotelio se ha desarrollado en el área de la patología cardiovascular por dos motivos principales. Por un lado, porque las alteraciones en la función endotelial se han asociado claramente con un mayor riesgo cardiovascular con significación clínica, como por ejemplo en el caso del angor pectoris.¹⁷⁻¹⁹ Y, por otro lado, y más recientemente, porque el uso de agentes bien conocidos con efecto benéfico sobre la patología cardiovascular, como las estatinas²⁰⁻²¹ o los

inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs)²²⁻²⁴, han demostrado una clara mejoría de dicha función endotelial.

De entre los métodos actuales de medición de la función endotelial, la vasodilatación mediada por flujo de la arteria humeral medida mediante el uso del eco-Doppler (FMD o *flow mediated dilatation*, en inglés), se ha destacado por sus múltiples ventajas respecto a otros métodos mucho más limitados. Dicha técnica fue descrita por Anderson y Mark en 1989²⁵ por primera vez y ha ido ganando aplicación en la investigación clínica a partir de la década de los noventa del pasado siglo.²⁶⁻³⁰

El planteamiento de este trabajo intenta rescatar esa fascinación y esa necesidad de los médicos y cirujanos clínicos por el estudio de los principios de su ciencia revisando, con óptica distinta, la que, como ya ha sido definida previamente, constituye la piedra angular de la fisiología y patología quirúrgica: la inflamación.

Mediante el estudio que aquí presentamos sugerimos que existe una inflamación asociada al acto quirúrgico que distorsiona la función endotelial del tono vascular en la circulación arterial. Este proceso puede ser identificado y cuantificado mediante el análisis de la vasodilatación mediada por flujo (FMD). Además se estudian las principales citocinas proinflamatorias implicadas en dicho proceso y su relación posible con el fenómeno de la disfunción endotelial que se asocia a la cirugía. Denotar y aclarar la existencia de este fenómeno fisiológico tan crucial a la cirugía debe permitir, no sólo un mayor conocimiento

de la respuesta biológica al acto quirúrgico, sino, además, la posibilidad, en un futuro cercano, de analizar, controlar y modificar las variables en juego en el proceso, a fin de proporcionar, a los pacientes quirúrgicos, las óptimas condiciones para la curación.

2 REVISIÓN CRÍTICA DEL PROBLEMA.

2.1 REACCIÓN INFLAMATORIA EN CIRUGÍA.

Clásicamente el término *inflamación* se usa para referirse a una reacción histopatológica por la cual existe un acúmulo en los tejidos de líquido, células como los leucocitos y sustancias químicas que provocan efectos por un lado localizados en el área de lesión como edema, hiperemia o dolor y, por otro lado, fenómenos sistémicos como por ejemplo la fiebre. La respuesta inflamatoria está muy relacionada con los procesos de la cicatrización y la reparación de los tejidos. De hecho la cicatrización implica indiscutiblemente un fenómeno de inflamación. Por tanto, la inflamación influye en los aspectos más fundamentales de la cirugía como son la recuperación, la cicatrización de las incisiones quirúrgicas, la curación de las heridas y los diferentes tipos de anastomosis y su evolución en el tiempo, por ejemplo. El uso de técnicas quirúrgicas, de materiales no biológicos y de sustancias farmacológicas actúan en un individuo como mecanismo detonador que activa distintos y complicados mediadores: el sistema neuroendocrino, la cascada de la inflamación, del complemento, de la coagulación, diversas citocinas y células. Del balance entre las sustancias proinflamatorias y antiinflamatorias que interactúan entre sí y de las características inherentes al paciente obtendremos manifestaciones clínicas que abarcan un amplísimo espectro, desde una reacción humoral subclínica a un síndrome de disfunción multiorgánica o incluso la muerte del paciente. El estudio exhaustivo de este dinámico proceso, extremadamente complejo y a la

vez muy incompletamente conocido se revela de gran utilidad para minimizar los efectos deletéreos de los pacientes sometidos a un proceso quirúrgico.

La homeostasis es una propiedad de los organismos vivos que consiste en la capacidad de éstos de mantener una condición interna estable compensando los cambios mediante un equilibrio dinámico mantenido mediante mecanismos autorreguladores. Sin embargo la línea de estabilidad es muchas veces frágil ante diferentes fuentes de agresión externa y dichos mecanismos defensivos, en un principio, pueden ser también potencialmente agresivos para las células, tejidos y órganos del propio organismo. Esto es especialmente factible cuando la agresión sobrepasa un cierto umbral de intensidad o existen agresiones reiteradas en corto espacio de tiempo o ante individuos con menor capacidad temporal o permanente de defensa.

De hecho, si nos concentramos en el traumatismo mecánico agudo que representa el acto quirúrgico únicamente, observamos que dicha energía mecánica es capaz de provocar como efectos iniciales una lesión de múltiples estirpes celulares y a su vez una respuesta inflamatoria secundaria a dicha lisis celular. La inflamación aguda local es conocida desde los tiempos más remotos de la medicina, siendo Celso quien enumeró los cuatro signos cardinales que la caracterizan: rubor, calor, tumor y dolor. Durante siglos la investigación sobre la inflamación fue casi exclusivamente descriptiva pero, al mismo tiempo, se la consideraba un proceso global y asociado directamente al individuo-paciente. Con el advenimiento de la biología molecular, el estudio de la inflamación asociada al acto quirúrgico ha contemporizado un conocimiento creciente de

los agentes en juego pero también una parcelación artificial de los mecanismos y sistemas operantes para una mayor comprensión y, a la vez, un distanciamiento a todas luces evidente del objeto de interés: el paciente. Además, a pesar de su enorme importancia, la reacción inflamatoria es estudiada, enseñada y aprendida principalmente sobre modelos que no tienen relación directa con el acto quirúrgico ni con sus componentes como son la inflamación asociada a la sepsis por infecciones bacterianas.

A pesar de ello, el estudio de las reacciones del organismo a la cirugía ha sido de gran interés para la comunidad científica durante años. Inicialmente, las investigaciones se centraron en la respuesta metabólica asociada al traumatismo (véase en este aspecto el estudio publicado en 1932 por David Paton Cuthbertson a propósito de cuatro pacientes con traumatismos en miembros inferiores).³¹ Tras ciertos trabajos sobre la respuesta a la agresión accidental, la atención se dirigió hacia el estudio del trauma asociado al acto quirúrgico y las diferentes respuestas observadas a las diversas técnicas quirúrgicas fueron expuestas para, posteriormente, centrarse, de manera entusiasta, en la capacidad de los agentes anestésicos y de los bloqueos nerviosos para modificar la respuesta endocrina y metabólica encontrando claro beneficio con el uso de anestesia regional. En la actualidad los sistemas nervioso, inmunológico y endocrino no se consideran sistemas aislados sino componentes de un mecanismo integrado de defensa. Recientes evidencias implican al endotelio como efector central de la respuesta inflamatoria. La energía mecánica o el agente lesivo inicial son capaces de estimular el endotelio que, por su situación estratégica, es capaz de integrar señales

mecánicas y bioquímicas de los diferentes medios del organismo y de responder a ellas mediante la liberación de sustancias vasoactivas, citocinas, factores de crecimiento y hormonas con efectos múltiples y variados.

Algunos autores³² definen diferentes fases en la respuesta a la agresión con sucesivos predominios de los sistemas nervioso, inmune y endocrino; aunque realmente lo que sucede al estímulo agresor quirúrgico es una verdadera cascada de respuestas interconectadas.³³ Así, en la primera fase, inmediata o precoz de la respuesta inflamatoria sobresalen las funciones nerviosas, es decir, sensitivas (dolor, analgesia), motoras (contracción y relajación muscular) y la activación del sistema nervioso simpático con un incremento en la secreción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) al corriente sanguíneo facilitando la aparición de taquicardia, taquipnea e hipertensión. En la segunda fase o intermedia prevalecerían las funciones consideradas inmunes, con producción de citocinas proinflamatorias, principalmente el, TNF, la IL-1 y la IL-6. Los picos de concentración de IL-6 se dan entre las primeras 18 y las 24 horas postoperatorias. La secreción de citocinas estimula el tejido hematopoyético de la médula ósea, en particular aquellas estirpes responsables del aumento de glóbulos blancos, especialmente neutrófilos y aumenta la producción de proteínas de fase aguda, la proteína C reactiva (PCR) en particular, que alcanza máximos de concentración plasmática en torno a las 48-72 horas tras la intervención. Y, por último, en la tercera fase o fase tardía, predominan las funciones consideradas endocrinas como son el anabolismo y la reparación tisular si la evolución es favorable o el catabolismo, la atrofia y la aplasia si la evolución es desfavorable. De todos modos, tal y

como se ha enunciado anteriormente, más que un proceso en etapas temporalmente bien delimitadas debemos entenderlo como un proceso en cascada, interrelacionado y sincrónico de los sistemas nervioso, endocrino e inmune. De este modo, aunque el componente endocrino lidere la fase tardía, en la fase precoz existe un aumento ya de la secreción de hormonas hipofisarias como la hormona del crecimiento, la corticotropina que estimula la secreción de cortisol en el córtex suprarrenal con pico de secreción de éste último a las 4-6 horas del agente agresor quirúrgico o la hormona antidiurética o vasopresina que actúa alterando el balance de fluidos a nivel renal. Y del mismo modo, en la fase tardía o endocrina y en caso de evolución benévola para el organismo, existe también un aumento de citocinas antiinflamatorias en los tejidos que permite recuperar la homeostasis.

Estas tres fases de la respuesta inflamatoria se deben considerar sistémicas originariamente aunque exista una mayor localización de su efecto cuando el estímulo es de pequeña intensidad con una duración de días o por el contrario pueden tener una repercusión generalizada y tener una duración de semanas o meses si el estímulo es de gran intensidad o cuando una patología previa amplifique un fenómeno inicial débil en origen. Si a este esquema compositivo intentamos añadir el papel del endotelio, existiría una primera fase inmediata o nerviosa con vasoconstricción y vasodilatación que causara revascularización; una segunda, intermedia o inmune, con exudación secundaria al aumento de permeabilidad y con migración celular, probables alteraciones de la coagulación y posible deterioro endotelial; y una tercera fase tardía o endocrina

con proliferación, “neovascularización” y remodelado tisular que llevaría a la regeneración tisular y a la cicatrización.³²

Aunque esta división en fases de la respuesta biológica al estímulo quirúrgico resulta especialmente didáctica, otros autores prefieren no hablar de fases y parcelar el estudio de la complicada e intrincada respuesta homeostática a la agresión quirúrgica en respuestas de los diferentes sistemas. Así hablaríamos de “respuesta de la fase aguda”, “respuesta neuroendocrina”, “respuesta metabólica” y “respuesta inmunológica” principalmente. Fisiopatológicamente no resultan excluyentes pero intentaremos definir brevemente los procesos de cada una de estas respuestas también con la idea de incluir, en esta revisión, los principales detalles de las perspectivas más implantadas con respecto al problema que nos atañe.

2.1.1 Respuesta de fase aguda.

La llamada respuesta de fase aguda o reacción de fase aguda se caracteriza por unos mecanismos que definiríamos como *sistémicos* pero que se producen en respuesta a un daño tisular *local* y que forman parte indisociable de los procesos inflamatorios de los organismos vivos. Los cambios originados tras el estímulo inicial se observan en períodos de horas o días y se inician por la producción y liberación de citocinas como el TNF- α , la IL-1 y la IL-6. Estas tres citocinas son los mediadores característicos de este tipo de respuesta junto con el incremento de la síntesis hepática de las proteínas de fase aguda, como la proteína C reactiva o factores del complemento, que precisan del estímulo de

las citocinas para aumentar su concentración plasmática en rangos de más del 25 %.³⁴ Al tiempo que se disminuye la concentración sérica de otras proteínas como la albúmina o la transferrina. El cambio en la producción hepática de proteínas va dirigida a dar cobertura a las necesidades inmunológicas, de coagulación y de reparación de los tejidos dañados. Esta respuesta se inicia inmediatamente tras la agresión desde el mismo foco traumático por la presencia en éste de múltiples agentes activadores primarios y secundarios: células desvitalizadas, péptidos de bacterias, receptores específicos de las membranas de los macrófagos, de los neutrófilos y de las células endoteliales activadas. Prácticamente todos los sistemas que actúan en cascada son activados en esta respuesta: complemento, coagulación, fibrinólisis, cininas y citocinas. Se activa el metabolismo del ácido araquidónico y con ello se estimula la presencia de los eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos). Se activan la histamina y la serotonina a nivel preferencialmente local.

Mediante la expresión de proteínas de superficie y la secreción de moduladores, el endotelio controla el tono vascular y la permeabilidad, regula la coagulación y dirige el tránsito de leucocitos hacia el área de inflamación. Las alteraciones de estas funciones normales pueden contribuir significativamente a una respuesta inflamatoria inadecuada, pudiendo conducir a la insuficiencia de múltiples órganos.³⁵

2.1.2 Respuesta neuroendocrina

Esta respuesta actúa principalmente como mediadora entre los efectos iniciales de la agresión y la ulterior respuesta metabólica y se caracteriza por cambios en las concentraciones séricas de diferentes hormonas, activación del eje hipotalámico-hipófisis-adrenal y activación del sistema nervioso autónomo. La activación del sistema nervioso simpático desde señales originadas en el foco de lesión o por una hipovolemia repentina y considerable del organismo incrementa la actividad adrenérgica y la concentración plasmática de catecolaminas con variaciones temporales de las concentraciones (mientras los niveles de noradrenalina pueden mantenerse elevadas hasta una semana tras la agresión, los de adrenalina suelen normalizarse en las primeras veinticuatro horas). La noradrenalina estimula los receptores alfa-2 y produce una intensa vasoconstricción del plexo cutáneo, mientras que la adrenalina, mediante activación de los receptores beta-2, induce una respuesta vasodilatadora en los músculos esqueléticos y el miocardio.³⁶

La activación del eje hipotalámico-hipófisis-adrenal produce un incremento de la concentración plasmática de la hormona del crecimiento dentro de las primeras veinticuatro horas tras la agresión quirúrgica, un aumento de la prolactina, aumento de los valores de hormona antidiurética como medida de ahorro de volemia tras las primeras veinticuatro horas y manteniendo niveles elevados hasta cinco días tras la agresión en caso de no complicaciones postoperatorias inmediatas o ausencia de quemaduras extensas y, a través de la liberación de hormona adrenocorticotropa (ACTH), liberación de cortisol, con

un aumento precoz dentro de las primeras ocho horas y recuperación en días de los valores basales.

La liberación de insulina queda inhibida por la descarga adrenérgica inicial. Tras varios días, se producirá un aumento de los niveles plasmáticos de insulina.

2.1.3 Respuesta metabólica

La respuesta metabólica básica consta de: 1) hiperglicemia, 2) pérdida de potasio, 3) retención de agua y sodio, 4) pérdida de nitrógeno con incremento de su eliminación urinaria en forma de urea, 5) aumento de los triglicéridos y ácidos grasos libres en el plasma.³⁷

La hiperglicemia se debe a la glucogenólisis existente ante el estímulo adrenérgico súbito, la gluconeogénesis y la resistencia periférica a la acción de la insulina en los tejidos.

El balance negativo del nitrógeno, demostrada por primera vez por Cuthbertson,^{31,38} es la consecuencia de la incrementada proteólisis periférica. La proteólisis muscular libera aminoácidos para ser utilizados en el hígado y no es un fenómeno que se ciña estrictamente al tejido muscular dañado.

La lipólisis se incrementa inmediatamente tras la agresión por estímulo adrenérgico del tejido adiposo y por los niveles elevados de cortisol y glucagón en sangre. Los ácidos grasos libres aportan energía alternativa.³⁹

2.1.4 Respuesta inmunológica

La capacidad de defensa del sistema inmunitario en un paciente que ha sufrido una intervención quirúrgica disminuye en caso de que la agresión alcance cierto nivel lesivo, provocando una mayor tendencia al desarrollo de infecciones. Así pues, tras agresiones quirúrgicas mayores se han demostrado reducciones en las proporciones de linfocitos T Helper así como de células asesinas por naturaleza o *Natural Killer*.⁴⁰ Y más recientemente hemos conocido como agentes anestésicos como el fentanilo, la ketamina o la clonidina son capaces de deprimir dicha actividad de defensa natural.⁴¹ Aunque una de las mayores influencias de la intervención quirúrgica sobre el deterioro de la respuesta inmunitaria está asociada a una reducción de la expresión de los antígenos leucocitarios humanos DR (HLA-DR) en los monocitos tras una agresión traumática importante. También se ha demostrado una correlación entre esta disminución de los monocitos que expresan los antígenos HLA-DR y un mayor riesgo de desarrollar infecciones posoperatorias. Cirugías traumatológicas más agresivas como la osteosíntesis pélvica o los clavos intramedulares muestran grandes disminuciones en la expresión antigénica de los HLA-DR frente a cirugías traumatológicas de menor agresividad como las osteosíntesis periféricas en las que no se observa un efecto de disminución significativo en este aspecto. Los elevados niveles de interleucina 10 en los

primeros casos con respecto a la falta de esta elevación en las cirugías menos agresivas podría explicar el proceso germinal de este fenómeno.⁴²

Este es un ejemplo más de que, a pesar de que son múltiples las sustancias químicas relacionadas con la inflamación, uno de los grupos de mediadores inflamatorios humorales más importantes e influyentes son, sin lugar a dudas, las citocinas.

2.2 FUNCIÓN DE LAS CITOCINAS COMO MEDIADORAS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA.

Aunque descubiertas anteriormente, no es hasta la década de los noventa del pasado siglo que unas nuevas moléculas salen a la escena con importancia creciente en el contexto de la respuesta inflamatoria en el organismo: las citocinas, con efectos locales e interacción con los sistemas inmunológico y neuroendocrino.⁴³⁻⁴⁵ Las citocinas pueden definirse como un conjunto de moléculas necesarias para la comunicación intercelular. Cumplen un papel fundamental en la actividad de la respuesta pro y antiinflamatoria, inducen la proliferación y diferenciación celular, la quimiotaxis, el crecimiento y la modulación de la secreción de inmunoglobulinas así como la remodelación de los tejidos. Las citocinas son proteínas o glucoproteínas de pequeño tamaño con funciones endocrina (poco frecuente), paracrina o autocrina.⁴⁶ A diferencia de las hormonas convencionales, como la insulina, las citocinas no son secretadas por glándulas especializadas sino por células que suelen encontrarse en el foco de origen de la inflamación. Las citocinas han sido

subclasificadas según su origen celular o la función principal descubierta. Así, las interleucinas se denominan así porque su producción fue descubierta, originalmente, a nivel de los leucocitos; las citocinas hematopoyéticas (CSF: factores estimuladores de colonias) por su capacidad para estimular colonias de la médula ósea; las quimiocinas por su inducción de la diapédesis, etc. Presentan dos características especiales: por un lado la *redundancia*, o sea, la capacidad de varias de ellas de realizar efectos biológicos similares y, por otro lado, su *capacidad pleiotrópica*, induciendo variados efectos biológicos según la presencia de células diana o de otros factores en el medio.³⁶

Las citocinas ejercen sus efectos al unirse a receptores específicos ubicados en las membranas de sus respectivas células diana. Estos receptores suelen presentar gran afinidad por ellas, razón por la cual ejercen habitualmente su acción a concentraciones séricas pequeñas o no detectables. Tras la exposición al estímulo agresor se produce la liberación de las principales citocinas proinflamatorias: Factor de Necrosis Tumoral (TNF), Interleucina 1 (IL-1) e Interleucina 6 (IL-6). Intentando contrarrestar y equilibrar el proceso se desencadena inmediatamente una respuesta antiinflamatoria mediada por citocinas antiinflamatorias, en especial la Interleucina 4 (IL-4), la Interleucina 10 (IL-10), la Interleucina 13 (IL-13) y el factor de proliferación y transformación (TGF).⁴⁷

El sistema neuroendocrino libera catecolaminas y corticoides que también van a inducir la liberación de mediadores inflamatorios y antiinflamatorios. Las citocinas más activas en la respuesta metabólica son también afectadas

directamente por las catecolaminas y el cortisol. La primera citocina que se produce ante una agresión es el TNF, que estimula a su vez la liberación de IL-1 e IL-6; TNF e IL-1 se estimulan entre sí y a la vez estimulan la producción creciente de IL-6. La IL-6, a su vez, inhibe la producción de TNF e IL-1 en un intento de *cerrar el ciclo* y evitar biológicamente una respuesta progresiva sin término. El cortisol, por su parte, inhibe la liberación de estas tres importantes citocinas pero actúa sinérgicamente con la IL-6 en la síntesis de proteínas de fase aguda por parte de las células hepáticas. Las catecolaminas a través de los receptores $\beta 2$ estimulan a la IL-6 y por medio de ella inhiben al TNF y a la IL-1.^{48,49}

Las citocinas proinflamatorias tienen un amplio espectro de actividad cardiovascular, facilitando la adhesión plaquetaria y de leucocitos en el endotelio vascular y promoviendo las propiedades procoagulantes del mismo por inducción de la actividad plaquetaria y disminución de la expresión de trombomodulina.⁵⁰

2.2.1 Interleucina-1 (IL-1) y Factor de Necrosis Tumoral.

La Interleucina 1 (IL-1) y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) son citocinas pluripotenciales que poseen estructuras diferentes. A pesar de que se unen a receptores celulares diferentes, sus variados efectos biológicos son coincidentes. Al inyectar IL-1 o TNF recombinantes en seres humanos se han observado múltiples efectos como fiebre, cefalea, anorexia, aumento de la concentración plasmática de nitrato, hipotensión arterial, neutrofilia,

neutropenia transitoria, aumento de la concentración plasmática de proteínas de fase aguda, hipoferremia, aumento de la concentración plasmática de interleucinas 6 y 8 (IL-6 e IL-8), hipercortisolemia y aumento de la concentración plasmática de ACTH. Más específicas son el aumento del número de plaquetas por parte de la IL-1 y el edema pulmonar, las lesiones hepatocelulares y la activación de las cascadas de la coagulación observadas tras la administración, en este caso, de TNF.

A través de su capacidad de activación de los linfocitos T, la IL-1 y el TNF son capaces de estimular todos los tipos de respuestas inmunitarias celulares y humorales, además de activar los macrófagos e inducir la expresión de otras citocinas y mediadores.

La IL-1 es sintetizada por una gran variedad de tipos celulares como los macrófagos, los monocitos, los linfocitos B y T, las células “Natural Killer” o NK, queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos y enterocitos. Entre los compuestos que pueden inducir su síntesis cabe destacar algunos productos de la pared celular de los microorganismos, como el lipopolisacárido de las bacterias gramnegativas o el ácido lipoteicoico de las grampositivas. También estimulan su producción otras citocinas como el TNF y la misma IL-1.

La IL-1 es un mediador inflamatorio de los de mayor potencia conocida. La inoculación de esta sustancia en voluntarios sanos en cantidades tan pequeñas como 1 ng/kg provoca sintomatología observable. Algunos de sus efectos fisiológicos ocurren por activación de la biosíntesis de otros mediadores

inflamatorios como la prostaglandina E2 (PGE2) y el óxido nítrico (NO). Y tan sobresaliente es su capacidad de producir fiebre en el organismo que es llamada, además, pirógeno leucocitario o pirógeno endógeno, siendo necesaria una ínfima cantidad de ésta, prácticamente indetectable, de unos pocos nanogramos, para alcanzar efecto pirógeno. De esta manera, cuando las bacterias o sus productos de degradación están presentes en los tejidos o en la sangre, son fagocitados por los leucocitos sanguíneos, los macrófagos tisulares y los linfocitos que, tras la digestión, liberan IL-1. La IL-1, en cuestión de unos 8-10 minutos, aumenta la temperatura corporal de modo significativo. Varios experimentos sugieren que esta sustancia induce la reacción febril mediante una creciente expresión de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) en muchos tipos celulares, obteniendo una producción aumentada de la PGE2 que actuaría a nivel del hipotálamo. Así, por ejemplo, este incremento en la producción de PGE2 en el sistema nervioso central mediado por IL-1 provoca hipertermia que puede ser bloqueada mediante la administración de inhibidores de la COX como el diclofenaco.³⁶

La IL-1 induce la activación de la enzima sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS)⁴⁹ en las células musculares lisas de las paredes vasculares y otros tipos celulares, lo cual produce un incremento del óxido nítrico (NO), potente vasodilatador en la pared vascular que seguramente tenga un papel fundamental en la hipotensión que produce la IL-1 en el vivo.

Niveles de concentración sérica elevados han sido demostrados en voluntarios sanos tras la inyección de lipopolisacáridos de origen bacteriano y

en pacientes con shock séptico. No obstante, en sujetos con endotoxemia o incluso en otros estudios del shock séptico los niveles encontrados son relativamente bajos, especialmente si se comparan con los de otras citocinas como la IL-6 y la IL-8.⁵¹

El factor de necrosis tumoral (TNF) se obtuvo inicialmente de animales expuestos al lipopolisacárido bacteriano y se comprobó que era una sustancia sérica capaz de matar a las células tumorales in vitro. Se observó así mismo que una administración de una dosis elevada de TNF inducía en ratones de experimentación un estado letal de shock, similar al producido tras inyección de lipopolisacárido bacteriano y que la inmunización con anticuerpos contra TNF protegía a los ratones frente a la mortalidad provocada por la endotoxina. Se le conoce también con el término extensivo de factor de necrosis tumoral alfa o TNF- α , debido a que posee una estructura parecida a la de otra citosina que inicialmente fue llamada TNF- β y que actualmente se conoce como linfotoxina α .

Aunque tanto los mastocitos, como los queratinocitos y los linfocitos sean capaces de segregarlo, la principal fuente de TNF se encuentra en los monocitos/macrófagos y, a excepción de los hematíes, todas las células poseen receptores para TNF.^{44,47} Sus funciones generales prominentes son la de iniciador de la apoptosis y la de potente mediador proinflamatorio. La cantidad de TNF que se sintetiza en respuesta a un estímulo proinflamatorio depende, en gran parte, de polimorfismos genéticos en las regiones no codificadoras del gen TNF.⁴⁸ Existen estudios que sugieren que estas

diferencias genéticas pueden guardar cierto significado clínico en la evolución de los pacientes a una agresión. Así, por ejemplo, en un estudio basado en pacientes con neumonías adquiridas en la comunidad, se observó que el riesgo de desarrollar shock séptico era mayor en los homocigóticos para el genotipo que definiríamos como de “mayor secretor de TNF”.⁵²

Dada, pues, la importancia capital de la IL-1 y el TNF como mediadores de la respuesta inflamatoria, se ha considerado la importancia que revestiría la posibilidad de bloquear sus efectos para combatir las alteraciones debidas a una inflamación excesiva o fuera de control homeostático.

Por un lado, los glucocorticoides, como la hidrocortisona y la dexametasona, son, y es ampliamente conocido en medicina, antiinflamatorios de gran potencia. Se ha averiguado que los corticoesteroides inhiben la liberación de TNF e IL-1 por parte de los monocitos y otras células por múltiples mecanismos. En modelos experimentales de sepsis realizados en laboratorio se observa que dosis elevadas de metilprednisolona o dexametasona permiten un aumento de la supervivencia en ratones. Desafortunadamente, al extrapolar estos hallazgos al escenario clínico nos encontramos con la imposibilidad de confirmar dichos efectos beneficiosos de la administración de dosis elevadas de glucocorticoides en pacientes con síndrome de distrés respiratorio del adulto o *shock* séptico en estudios realizados a finales de los años ochenta y que hicieron abandonar paulatinamente dicha vía de investigación.^{53,54} Sin embargo, recientemente, estudios con dosis bajas de estas sustancias parecen

poder mejorar la hemodinámica sistémica o la función pulmonar en este tipo de pacientes.^{55,56}

Los glucocorticoides, dados sus amplios efectos, representan un mecanismo poco selectivo, de todos modos, para bloquear los efectos proinflamatorios mediados por IL-1 o TNF. Paralelo al descubrimiento del modo de actuación y vida de estas citocinas, se han ido desarrollando sustancias químicas capaces de bloquear a éstas o de competir por sus receptores. Desgraciadamente los resultados obtenidos con estos nuevos fármacos antiinflamatorios con respecto a placebo en diferentes estudios clínicos prospectivos han sido decepcionantes en el campo de la sepsis. Por otro lado, sí se ha observado que varios de los fármacos diseñados para neutralizar a alguna de estas dos citocinas fundamentales sí tienen una eficacia clínica en otros escenarios de la inflamación diferentes a la sepsis como la enfermedad de Crohn, el asma grave o la artritis reumatoide. Un anticuerpo monoclonal anti-TNF, el infliximab,⁵⁷ está autorizado por la FDA (Food and Drug Administration) para los pacientes con enfermedad de Crohn y para inhibir la progresión de las lesiones estructurales y mejorar la función física de pacientes con artritis reumatoide muy activa que no han respondido adecuadamente al tratamiento con metrotexato. La misma autorización existe para el uso de adalimumab, otro anti-TNF, en pacientes con artritis reumatoide. El etanercept, otro anti-TNF está autorizado también por la FDA para tratamiento de la artritis psoriásica y se ha observado que es capaz de reducir la hiperreactividad bronquial en el asma grave. Por otro lado, la anakinra, una sustancia anti-IL-1, sola o combinada con otros fármacos guarda

un efecto positivo en la reducción de la sintomatología y de la aparición de lesiones en los pacientes con artritis reumatoide muy activa.⁵⁸

La trombosis, en su más clara definición, la formación de un coágulo sanguíneo en el interior de un vaso, es un mecanismo dentro del proceso inflamatorio que permite aislar a los microorganismos invasores dentro de una zona lesionada acotada. La IL-1, la IL-6 y el TNF, de modo predominante aunque también existen otras citocinas que lo favorecen en menor grado, tienen capacidad para favorecer la expresión del factor tisular de tromboplastina o factor III, una glicoproteína de membrana con alta afinidad por el factor VII de la coagulación⁵⁹, que permite la activación de la vía extrínseca de la coagulación. El factor III/Factor VII activado activa a su vez el Factor X, activando a su vez el factor II, la protrombina, convirtiéndolo finalmente en trombina. Por otra parte, estas citocinas inhiben la expresión de trombomodulina en las células endoteliales, un importante inhibidor endógeno de la coagulación.⁵⁹

2.2.2 Interleucina-6 (IL-6).

La interleucina 6 o IL-6 está formada por 184 aminoácidos más una secuencia hidrófoba de señalización de otros 28 aminoácidos. La proteína experimenta una fosforilación y una glucosilación variables antes de su secreción.⁴⁷ Del mismo modo que IL-1 y el TNF, la IL-6 es una citocina pluripotencial muy relacionada con la respuesta inflamatoria a las infecciones o a las lesiones. Esta citocina puede ser sintetizada por monocitos, macrófagos,

linfocitos, células endoteliales, eosinófilos, células de la glía y epitelio intestinal. Entre los factores inductores de su secreción cabe destacar la IL-1, el TNF, el factor activador plaquetario, los metabolitos de oxígeno reactivos (anión radical superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo) y los lipopolisacáridos bacterianos. Entre sus efectos,⁴⁶ la IL-6 es capaz de inducir fiebre, la diferenciación de células B, la proliferación de células T, estimular el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenales y es uno de los más precoces e importantes mediadores de la inducción y el control de la síntesis y liberación de proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva (PCR) por los hepatocitos.

Las concentraciones de IL-6 en sangre aumentan espectacularmente tras una lesión tisular, un traumatismo accidental o una quemadura, detectándose a partir de 60 minutos tras la agresión. Del mismo modo, en los pacientes con sepsis o *shock* séptico se observa, siempre, un aumento de las concentraciones plasmáticas de IL-6 y se ha comprobado que la magnitud de ese aumento tras un traumatismo tisular o durante la sepsis se correlaciona con el riesgo de complicaciones postlesionales y con el riesgo de muerte asociada.⁶⁰⁻⁶² Aún queda por dilucidar si dichas concentraciones elevadas son perjudiciales *per se* o representan un marcador de la gravedad del proceso sin impacto directo, pero el hecho de que la neutralización inmunológica de la IL-6 mejore el pronóstico en la peritonitis bacteriana en estudios experimentales parece indicar que altas cantidades de esta interleucina son, realmente, perjudiciales. Además, el bloqueo de la IL-6 ha aportado mejoras en enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide y la artritis idiopática juvenil.⁶³

La respuesta máxima de IL-6 tras una intervención quirúrgica se ha estudiado muy recientemente, siendo máxima entre las 12 y las 24 horas tras el insulto. Según algunos de estos estudios prospectivos, únicamente los valores de IL-6 y PCR³³ están sobradamente asociados con la magnitud de la lesión quirúrgica.

Cabe recordar aquí que, a pesar de ser una citocina considerada, por sus efectos, de pleno derecho como proinflamatoria, también es capaz de ejercer propiedades antiinflamatorias por la liberación de receptores solubles de TNF e IL-1^{47,49} y por conseguir una reducción amplia de la expresión de ambas citocinas.⁶⁴

2.3 INFLAMACIÓN Y ENDOTELIO.

2.3.1 Papel del Endotelio.

El endotelio es una fina lámina monocelular que tapiza y forma la capa más interna de todos los vasos del organismo. Diferentes modelos mantienen que el número aproximado de células endoteliales sería de 10^{13} , con un peso de 1,5 Kg y una extensión aproximada⁶⁵ de 4000 a 7000 m², equivalente a la superficie que ocupa la catedral de Mallorca⁶⁶. A pesar de sus impresionantes dimensiones y de una localización tan decisiva en la interfaz entre los elementos circulantes de la sangre y la pared vascular, esta estructura, de funciones importantísimas, ha permanecido ignorada durante años por el

desarrollo de la ciencia médica y no es hasta recientes décadas cuando, bruscamente, se le otorga una importancia crucial al papel de control de funciones fisiológicas esenciales al organismo que esta fina capa de células parece detentar. Las razones de esta relegación histórica son varias. Por una parte, porque desde sus primeras descripciones anatómicas, el sistema vascular ha sido entendido como “una bomba unida a un sistema de tubos” cuya principal función ha sido la de, simplemente, permitir el transporte de oxígeno y nutrientes a los diferentes tejidos del organismo. Además, el progreso secular de la Semiología Clínica con el desarrollo creciente de las técnicas exploratorias del paciente (observación, palpación, percusión, auscultación) nunca han conseguido aportar datos positivos sobre el estado del endotelio. Finalmente, porque el desarrollo de los métodos y técnicas necesarios para la exploración de la fisiología del endotelio no ha alcanzado una madurez aceptable hasta hace apenas unos pocos años y únicamente en el campo de la ciencia experimental.

A principios del siglo XX, el cirujano inglés Joseph Lister afirmaba que los vasos jugaban un importante papel en el mantenimiento del estado líquido de la sangre. En las décadas finales del siglo XIX, se había observado como la sangre no se coagulaba en un sistema vascular vivo y sí en uno muerto. Estas son las primeras referencias al papel del endotelio en el organismo.

Las células endoteliales, aplanadas, forman un mosaico que reposa sobre una membrana basal rica en glicoproteínas y colágeno. Compleja función, pues, la de estas células que, por una parte, deben favorecer el flujo sanguíneo

y, por otra parte, reposan sobre una carga de colágeno, potente activador de plaquetas y de la coagulación.^{67,68}

La superficie endoluminal de las células endoteliales está cubierta por un manto muy fino llamado glicocálix, identificado en los década de los sesenta del pasado siglo gracias al desarrollo de la microscopía electrónica⁶⁹. El glicocálix está formado por glicoproteínas, glicosaminoglicanos y proteoglicanos.⁶⁸ Entre sus funciones tiene un papel predominante en la coagulación. El glicocálix amplifica las propiedades anticoagulantes de la antitrombina III, interacciona con el cofactor II de la heparina, expresa la trombomodulina y un potente inhibidor del factor VII activado, su carga eléctrica negativa rechaza las plaquetas circulantes y además es capaz de catalizar los factores de la coagulación dependientes de la vitamina K⁷⁰. Regula, además, la permeabilidad capilar así como la interacción entre el endotelio y los leucocitos circulantes, favoreciendo su denudación y la adhesión de los leucocitos al endotelio.⁷¹

En el citoplasma de las células endoteliales encontramos los cuerpos de Weibel-Palade, que son vesículas de almacenaje de múltiples proteínas como el factor de von Willebrand y la P-selectina. El factor de von Willebrand posee una importancia trascendental en la hemostasia primaria, mientras la P-selectina la mantiene en la inflamación⁷², permitiendo el reclutamiento de leucocitos y la migración de éstos a los diferentes sitios de lesión.

Las células endoteliales son capaces de modificar su estructura y sus funciones en respuesta a un estímulo físico (por ejemplo una modificación del flujo sanguíneo) o a un estímulo químico. Cultivadas estáticas *in vitro*, mantienen una forma cúbica. En cambio, cuando son sometidas a fuerzas de cizallamiento, como en una cámara de perfusión que simula el flujo sanguíneo, alcanzan una forma alargada en el sentido del flujo tras unas horas.⁷³ In vivo, se observa esta organización alargada, sobretodo en las arterias, donde las fuerzas de cizalla son de 30 a 50 veces mayores que en las venas. Para ilustrarlo, se puede citar el ejemplo de los injertos aortocoronarios⁷⁴, donde las células endoteliales de los injertos de vena safena, tras conectarse al flujo arterial, modifican su morfología, alargándose con su eje principal paralelo al sentido del flujo.

Los receptores sensibles a estos estímulos físicos son conocidos: receptores con actividad tirosin-cinasa, las integrinas, los canales de potasio, las proteínas G heterotriméricas y la nicotamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa.⁷⁵

Dada la variedad de respuesta, tanto de la estructura como de las funciones de este tipo celular, debemos ser prudentes en la interpretación y aceptación de estudios sobre el endotelio realizados *in vitro* o sobre vasos aislados al flujo. De ese modo -y es una consideración personal- consideramos esencial realizar su estudio, siempre que sea posible, en condiciones reales en sujetos o pacientes a fin de que las conclusiones extraídas puedan ser más fiables en el plano biológico.

Las funciones fisiológicas del endotelio son múltiples.⁶⁸ Por una parte, modulan la hemostasia primaria, puesto que participa en la activación plaquetaria y produce varios factores de la cascada de la coagulación y del sistema fibrinolítico. Por otra, una de sus funciones principales consiste en mantener el estado fluido de la sangre, al presentar una superficie que inhibe la activación plaquetaria y la cascada de la coagulación. Así pues, las células endoteliales pueden orientar su programa genético hacia un fenotipo pro- o anticoagulante en función de los factores físicos o químicos actuantes.

La célula endotelial, por su localización entre la sangre y los tejidos, desempeña también un papel crucial en todas las fases de la inflamación aguda o crónica, al controlar el ingreso de mediadores y de células inflamatorias a los focos de los tejidos agredidos expresando, además, moléculas de adhesión que facilitan la adherencia y migración de los leucocitos hacia el compartimento tisular con el fin de eliminar un agente patógeno o limpiar una zona necrosada.

Además participa de modo principal en la regulación del tono vasomotor, liberando sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico (NO), la prostaciclina (PGI₂) y mediadores vasoconstrictores como la endotelina (ET) y el factor activador de la plaqueta (PAF). El óxido nítrico (NO) es el principal agente vasodilatador de origen endotelial. Se produce a partir de L-arginina por la sintasa de óxido nítrico endotelial constitutiva (eNOS). Los agentes capaces de estimular la eNOS son el adenosín difosfato (ADP), la bradiquinina, la sustancia P, los agonistas muscarínicos y las fuerzas de cizalla. El aumento de

la actividad de la eNOS por las fuerzas de cizalla permite la vasodilatación inducida por el aumento del flujo tras el ejercicio físico.⁷⁶ Entre otras funciones del NO figuran la inhibición de la activación de la adhesión plaquetaria al endotelio, además de favorecer la desagregación plaquetaria tras la formación del trombo hemostático.

Existen, además, dos otras formas de sintasa de óxido nítrico, aunque con un papel mucho mas circunstancial y accesorio: la forma neuronal dependiente de calcio (nNOS) y la NOS inducible (iNOS) o NOS independiente de calcio, inducida principalmente por las citocinas proinflamatorias.

La labor, pues, del endotelio en el proceso inflamatorio es fundamental tanto en el plano molecular como en el celular y el histológico. Y el mayor conocimiento de esta compacta y robusta relación nos permite, actualmente, inaugurar una nueva visión del endotelio como *órgano* y de la inflamación como *proceso* que, lejos de aislarse de las bases previas del conocimiento y método científico y médico, enriquecen y enlazan con cuestiones aún no resueltas. Valga como muestra el aumento del flujo sanguíneo tisular y de la permeabilidad permitida por este endotelio que son la causa del eritema y del edema local, signos conocidos ancestralmente y ya clásicos del proceso inflamatorio.

2.3.2 Inflamación y función/disfunción endotelial.

Lejos debería quedar ya la concepción del endotelio como mero “contenedor” de sangre puesto que ya conocemos que, en realidad, se trata de una barrera “funcional” entre la corriente sanguínea y la pared del vaso. El término “disfunción endotelial” es usado ampliamente para describir cualquier forma de actividad anormal del endotelio.

Lo más frecuente y característico es un deterioro de la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) a causa de la reducción de la producción de éste por la eNOS y/o por el aumento de la degradación de NO por las especies reactivas de oxígeno. La fuerza de cizallamiento tangencial es un factor activador clave de la eNOS en circunstancias fisiológicas^{77,78} y es evidente el hecho de que una alteración patológica del endotelio redundará, tras aplicación de dicha fuerza, en una menor producción de NO y, por tanto, en una menor vasodilatación asociada. Cabe recordar aquí que la importancia del NO no radica únicamente en sus funciones vasodilatadoras puesto que esta molécula, además, posee efectos tromboreguladores e influye en la adhesión y la proliferación celular. La prostaciclina, un producto del sistema de la ciclooxigenasa, es otro vasodilatador derivado del endotelio que actúa de manera independiente al NO, pero desempeña un papel limitado en el mantenimiento del tono vascular. El endotelio interviene también en la hiperpolarización de las células del músculo liso vascular a través de una vía independiente del NO que aumenta la conductancia para el potasio y facilita la posterior propagación de la despolarización de las células del músculo liso

vascular para mantener el tono vasodilatador.⁷⁹ Resulta, pues, evidentísimo que un deterioro en el funcionamiento endotelial repercutirá en una menor capacidad de vasodilatación vascular.

El endotelio participa activamente, asimismo, en la defensa del organismo contra los agentes patógenos reclutando a los leucocitos del corriente circulatorio hacia los focos de infección, liberando mediadores inflamatorios y favoreciendo localmente la coagulación, para evitar así la difusión hematógena de la infección. No obstante, esta respuesta focal y adaptada puede generalizarse, amplificarse por ejemplo durante una sepsis y provocar daños tisulares. Se habla entonces, también, de disfunción endotelial.

El paradigma de un estado inflamatorio es el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, definido como una respuesta inflamatoria sistémica a una variedad de insultos clínicos.³⁶ Está definida por la presencia de 2 o más de los siguientes criterios:

1. Temperatura mayor de 38 °C o menor de 36 °C.
2. Frecuencia cardíaca superior a 90 latidos por minuto.
3. Frecuencia respiratoria mayor de 20 respiraciones por minuto o presión arterial de dióxido de carbono menor de 32 milímetros de mercurio.
4. Leucocitos en sangre superiores a 12.000 células/mm³, o bien inferior a 4.000 células/mm³, o bien más de un 10% de formas inmaduras en sangre periférica.

La sepsis se entiende como la respuesta inflamatoria sistémica ante un proceso de etiología infecciosa. Atendiendo a este arquetipo del estado inflamatorio y a su relación con el endotelio cabe afirmar que la sepsis consigue una alteración de la barrera endotelial y una denudación endotelial, que favorece el paso de células, mediadores inflamatorios y plasma hacia el sector intersticial.

Algunos estudios han demostrado que la inyección de lipopolisacáridos de la membrana de bacterias Gram negativas en los animales induce un desprendimiento de las células endoteliales de la membrana basal y un edema subendotelial.⁸⁰ Las lesiones celulares consisten en una vacuolización nuclear y en una protusión y fragmentación citoplasmática. Este fenómeno también se ha encontrado en la investigación en humanos.⁸¹ Los mediadores inflamatorios liberados por los leucocitos (TNF α , IL1, interferón, radicales libres del oxígeno y la hipoxia) aceleran el paso a apoptosis de las células endoteliales.⁸²⁻⁸⁴ Éstas expresan además moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1), liberan radicales libres y, por tanto, amplifican el reclutamiento de glóbulos blancos, creando un círculo vicioso. Las células endoteliales apoptóticas exteriorizan la fosfatidilserina (con carga negativa) hacia la capa más externa de la membrana celular y presentan al corriente circulatorio una superficie procoagulante.⁸⁵ Dicha asimetría de carga en la membrana asociada a la actividad de ciertas enzimas permite la liberación de micropartículas a la circulación. Estas micropartículas asocian fragmentos fosfolipídicos y proteínas de superficie de la membrana que están implicadas en la diseminación de la disfunción

endotelial^{86,87} y participan en el proceso de coagulación intravascular diseminada.⁸⁸

La producción de NO y de PGI₂ por las células endoteliales también se encuentra alterada en los procesos inflamatorios. Y puesto que estas moléculas controlan, no solamente el tono vascular, sino también la producción de t-PA y la adhesión leuco-plaquetaria, la disminución de su liberación favorece la adhesión y la agregación leuco-plaquetaria y la activación de la coagulación. Esta cadena activada provoca el depósito de fibrina a nivel de diferentes órganos, lo cual agrava la isquemia local.⁸⁹

Por otro lado, la sepsis grave altera también la otra función endotelial primordial que es la regulación del tono vasomotor, dando lugar a cuadros clínicos variables caracterizados por una notable inestabilidad hemodinámica, que es consecuencia del desequilibrio de dicho tono y de una fuga plasmática intersticial, siendo la perturbación en la producción de NO el principal responsable de dicho proceso.

Las alteraciones en la producción de NO en el transcurso de la sepsis son complejas, no están completamente aclaradas y evolucionan en el tiempo. En lo que definiríamos como una primera etapa de “*nitrosopenia*”, existe una disminución de la producción de NO por parte de la eNOS.⁹⁰ Los mecanismos parecen ser múltiples. *In vitro*, la estimulación con TNF o endotoxinas de las células endoteliales se acompaña de una disminución de la producción de ARN mensajero de la eNOS.^{91,92} En la rata,⁹³ la inducción de un shock séptico

provoca una disminución de la densidad endotelial de eNOS y en el conejo, la inyección de endotoxina alteraría la relajación dependiente del endotelio de cinco a veinte días.⁹⁴ En el contexto de humanos sanos, una breve exposición a endotoxina induce una disminución de la relajación dependiente del endotelio también.⁹⁵⁻⁹⁶

Posteriormente, se impone una segunda etapa, durante la cual existe un aumento de la producción de NO por parte de la iNOs. Esta sobreproducción inducirá una vasodilatación más difusa de la microcirculación y, por tanto, una caída de la presión arterial. Además el NO en exceso puede interaccionar con el radical anión superóxido y fabricar peroxinitrito, un potente agente oxidante. Esta sobreproducción tardía de NO en los estados sépticos ha motivado la realización de estudios terapéuticos con vistas a bloquear las sintasa de óxido nítrico, por ejemplo con L-N^G-Nitroarginina-metil-éster (L-NAME), un inhibidor funcional de las NOS. Pero en los estudios experimentales con animales^{97,98} los resultados han resultado contradictorios y no resulta posible extraer conclusiones fiables de ellos. Cabe recordar las importantes diferencias fisiopatológicas que existen entre las especies y como este aspecto dificulta la extrapolación de las conclusiones de estos estudios al humano.

La exposición de las células endoteliales a citocinas proinflamatorias provoca la expresión en la superficie celular de moléculas de adhesión y disminuye la relajación vascular dependiente del endotelio.¹² Fichtlscherer y colaboradores⁹⁹ demuestran una correlación inversa entre PCR y la reacción del flujo sanguíneo en el antebrazo en respuesta a acetilcolina en hombres con

enfermedad coronaria. Además, en dicho estudio, la reducción paulatina de los niveles de PCR a los tres meses va asociada a una normalización del flujo sanguíneo mediado por el endotelio a nivel del antebrazo. En otro estudio realizado por Cleland y colaboradores¹⁰⁰ se muestra una relación directa entre inflamación de bajo grado y síntesis de NO. Hingorani y otros autores,¹⁰¹ en un interesante trabajo, analizan la respuesta inflamatoria resultante tras la vacunación para *Salmonella typhi* de 12 pacientes sanos, encontrando que la vacunación no sólo provoca una leve reacción inflamatoria sino también una profunda aunque pasajera disfunción del endotelio arterial.

Los tratamientos antiinflamatorios mejoran la función endotelial. Bhagat y Vallance¹² muestran que la administración de hidrocortisona (100 mg) y una dosis alta de aspirina (1000 mg) previenen la disfunción endotelial inducida por citocinas en controles sanos, mientras que dosis de aspirina de 75 mg no. El tratamiento de vasculitis primaria sistémica con esteroides y/o ciclofosfamida se asocia a una normalización de la función endotelial.¹⁰² Miyazaki y colaboradores¹⁰³ muestran que una simple sesión de hemodiálisis daña la vasodilatación mediada por flujo pero que la diálisis con uso de Vitamina E no la empeora.

La disfunción endotelial también es provocada por múltiples trastornos como la hipertensión arterial, la dislipemia o el tabaquismo, que ya son conocidos factores de riesgo cardiovascular y cuyo perfil *inflamatorio* se revela creciente de día en día. Por su parte, la disfunción del endotelio distorsiona el balance

regulatorio del organismo provocando que éste se decante hacia una progresión de la enfermedad arteriosclerótica.

2.3.3 Relación entre inflamación sistémica, enfermedad cardiovascular y disfunción endotelial.

El endotelio es una estructura muy sensible a los cambios en las fuerzas hemodinámicas y reacciona a ellas sintetizando y liberando múltiples sustancias vasoactivas. La homeostasis “vascular” se mantiene a fe de un balance entre los factores dependientes de dicho endotelio “vasodilatadores” por un lado y “vasoconstrictores” por el otro. Los procesos inflamatorios así como los múltiples y conocidos factores de riesgo cardiovascular son capaces de romper este equilibrio promoviendo la aparición de la placa de ateroma e iniciando y promoviendo continuamente la arteriosclerosis.

El término “disfunción endotelial” engloba un amplio concepto que implica una disminución en la producción o en la disponibilidad del óxido nítrico (NO) y/o una alteración del balance entre los factores *vasodilatadores* (NO como sustancia más importante) y *vasoconstrictores* (por ejemplo endotelina 1 y angiotensina) del endotelio.¹⁰⁴ La afectación de la función endotelial normal en las arterias coronarias (siendo este ejemplo extensible a todos los territorios arteriales) a causa de la arteriosclerosis, provoca una vasoconstricción paradójica que reduce la perfusión miocárdica y puede provocar isquemia del órgano. No obstante, la disfunción endotelial puede ocurrir -y ser detectada- mucho antes de que existan manifestaciones estructurales de la

arteriosclerosis en los vasos, pudiendo servir, dicha detección, como elemento predictor independiente de los eventos cardiovasculares por venir.

Además de la importante función vasodilatadora del NO, esta molécula protege contra el daño vascular y la trombosis, inhibe la adhesión leucocitaria al endotelio, reduce la proliferación de las células musculares lisas de los vasos y limita la agregación plaquetaria actuando pues, siempre, como factor protector del desarrollo arteriosclerótico.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

Cuando se inicia un proceso inflamatorio que afecta a las células endoteliales, éstas aumentan su expresión de moléculas mediadoras en la adhesión de leucocitos al endotelio vascular: selectinas (familia de glucoproteínas de membrana que actúan como receptores de adhesión), VCAM-1 (proteína de adhesión a las células vasculares o *vascular cell adhesion protein 1*) e ICAM-1 (proteína de adhesión intercelular 1 o *intercellular adhesion molecule 1*). La expresión de todas estas moléculas de adhesión está inducida por citocinas proinflamatorias como la IL-1 y el TNF y la proteína de fase aguda PCR producida por el hígado en respuesta a la IL-6. Tras la adhesión, los monocitos migran a través de la íntima hacia el interior de la pared vascular para convertirse en macrófagos que empiezan a expresar receptores basureros o escoba (*scavenger receptors*), tales como SR-A, CD36 y LOX-1. Este tipo de receptores, cuya función es la de retirar del medio ciertas sustancias reconocidas como extrañas, reconocen lipoproteínas de baja densidad (LDL) modificadas que son introducidas en los macrófagos. Este proceso acaba generando células espumosas (*foam cells*) a partir de los

macrófagos iniciales y marca el inicio de la formación de la placa de ateroma. Desde ese núcleo se empiezan a liberar de nuevo citocinas proinflamatorias que mantienen el estímulo quimiotáctico para la adherencia leucocitaria al endotelio generando un circuito patológico retroalimentado y creciente. Los macrófagos no son las únicas células que contribuyen a la formación de las placas de ateroma, otras células como los linfocitos también son reclutados al foco de lesión a través de moléculas de adhesión y segregación de citocinas y metaloproteinasas de matriz (MMPs) que perpetúan el efecto.

Además de los múltiples estudios de la fisiopatología de la arteriosclerosis, que parecen relacionarla muy estrechamente con una disfunción endotelial, múltiples observaciones sugieren que una vasorelajación mediada por el endotelio aberrante es un marcador precoz de arteriosclerosis y que la vasodilatación anormal mediada por flujo se encuentra en aquellos pacientes con desarrollo de enfermedad coronaria.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Y en los pacientes con enfermedad coronaria establecida, la disfunción endotelial se ha correlacionado directamente con mayor probabilidad de eventos cardiológicos.^{27,111-115} Es en este campo de las enfermedades cardiológicas donde, en las últimas décadas, se han desarrollado la práctica totalidad de los estudios dirigidos a la medición de la disfunción endotelial y a la clarificación de su valor predictivo para la aparición de eventos cardiovasculares.

2.3.4 Métodos de medida de la función endotelial.

En la literatura científica aparecen descritos una gran variedad de métodos invasivos y no invasivos para intentar medir la actividad y la función endotelial en un momento determinado. Por un lado la cuantificación analítica de una elevación de marcadores en la sangre como las moléculas de adhesión, las selectinas o la proteína C reactiva. Aunque el aumento de dichas sustancias en el plasma pueda estar asociado a una disfunción endotelial, distinguir entre un endotelio “estimulado” y un endotelio realmente “dañado” es verdaderamente difícil. Por otra parte, los estudios basados en medir la actividad del principal compuesto vasoactivo del endotelio, el NO, o de sus metabolitos o de su segundo mensajero, el guanosín monofosfato cíclico (GMPc) en plasma u orina se enfrentan a un doble problema: la dificultad de interpretación de los hallazgos y la enorme influencia que la dieta individual posee en las cantidades de dichas sustancias en los líquidos corporales,¹¹⁶ hecho que, de no estar controlado, puede invalidar los resultados obtenidos. De este modo, la tendencia actual, con el fin de evaluar la función endotelial, no es tanto la de buscar metabolitos o productos originarios de la célula endotelial como la de medir, directamente, dicha función mediante métodos invasivos o no.

Existen exámenes funcionales invasivos que precisan de un estímulo bioquímico que provoque una *respuesta* endotelial que analizaremos posteriormente. Entre ellas podemos contar con la visualización directa de la respuesta vasodilatadora a la acetilcolina en las arterias coronarias mediante angiografía y con el estudio de la circulación del antebrazo mediante

pletismografía tras infusión humeral de una variedad de sustancias vasodilatadoras. Técnicas estudiadas y validadas¹¹⁷ pero cuyo uso clínico es muy restringido por su naturaleza invasiva *per se*.

El avance más reciente en el análisis de la función endotelial con su posible aplicación futura en la clínica ha sido el desarrollo de técnicas no invasivas de evaluación directa. Podemos encontrar, por un lado, la tomografía por emisión de positrones (PET) con el análisis de la reducción de la reserva de flujo coronario antes y tras la provocación con adenosina o dipiridamol.¹¹⁸ Es un estudio metabólico de observación directa y no invasiva pero se enfrenta a un coste muy elevado y a la exposición a radiación de los sujetos investigados. Y, por otro lado, la pletismografía del antebrazo¹¹⁹ y el estudio eco-doppler de la arteria humeral en la técnica de vasodilatación mediada por flujo.^{25,26} Cabe destacar que los datos cosechados hasta el momento sugieren que la hiperemia obtenida en el antebrazo mediante la pletismografía es menos dependiente de la liberación de NO que el flujo en las arterias de mayor calibre como la humeral y que, además, las medidas pletismográficas del antebrazo muestran una elevada variabilidad entre un día y otro, limitando su aplicación en estudios de seguimiento.

Todas estas razones hacen que la técnica de vasodilatación mediada por flujo de la arteria humeral sea la más aceptada y ampliamente usada y mantenga, a día de hoy, las mejores perspectivas para su paso desde el campo de la investigación al de la actividad clínica diaria. Posteriormente analizaremos con detalle esta técnica diagnóstica.

2.4 CONTROL DEL FLUJO SANGUÍNEO Y LA VASODILATACIÓN MEDIADA POR FLUJO EN LA CIRCULACIÓN HUMANA.

Uno de los principios más fundamentales de la función circulatoria es la capacidad de cada tejido de controlar su propio flujo sanguíneo local en proporción a sus necesidades metabólicas, las cuales varían en relación a múltiples factores a lo largo del tiempo. La importancia que la evolución ha dado a este desarrollado control del flujo sanguíneo radica en la imposibilidad de asignar a todas horas una gran cantidad de flujo sanguíneo a todos los tejidos del cuerpo, independientemente de la actividad desarrollada en el momento. Para hacerlo, el cuerpo humano precisaría una cantidad ingente de sangre, mucho mayor que la que el corazón humano sería capaz de bombear. Experimentalmente se ha demostrado que el flujo sanguíneo a cada tejido se regula al nivel mínimo que satisface sus necesidades. Con este control tan preciso, los tejidos nunca sufren déficit de nutrientes y se mantiene en el mínimo la carga de trabajo del corazón.

Los mecanismos *locales* de control del flujo sanguíneo tisular sólo pueden dilatar los microvasos muy pequeños situados en el mismo tejido, debido a que los mecanismos de retroacción local causados por sustancias vasodilatadoras o por el déficit de oxígeno sólo pueden alcanzar estos vasos, no las arterias intermedias o mayores situadas corriente arriba. Sin embargo, cuando el flujo sanguíneo de la porción microvascular de la circulación se incrementa, se pone en marcha secundariamente otro mecanismo que dilata las arterias más grandes: las células endoteliales que revisten las arteriolas y las arterias

synthetize nitric oxide that affects the degree of contraction of the arterial wall. The rapid flow through the arteries causes "shear stress", force of shear (or *shear stress* in the scientific literature in English) of the endothelial cells due to the viscous traction that the blood exerts on the vascular walls. This stress stretches the endothelial cells following the direction of the flow and causes a great increase in the release of nitric oxide.³⁶ Nitric oxide relaxes the arterial wall, allowing its dilation. It is a fortunate mechanism, because it causes a secondary increase in the dimensions of the larger vessels whenever the flow in the microvascular system increases.

The pioneering experiences of Furchgott and Zawadzki¹²⁰ were the first to demonstrate this vasodilator factor derived from the endothelium, which resulted in the discovery of nitric oxide (NO). NO is generated from L-arginine by the action of the eNOS. This gas diffuses into the smooth muscle cells of the vascular wall and activates guanylate cyclase, which provokes vasodilation. Additionally, the endothelium mediates the hyperpolarization of the smooth muscle cells of the vessels through an action independent of the production of NO, increasing potassium conductance and propagating a depolarization of the smooth muscle cells in order to maintain the vasodilator tone.¹²¹

The endothelium, therefore, is a fundamental mechanism in the maintenance of the vascular tone and participates in the regulation of the blood flow according to the changing needs of the perfusion of the different organs and tissues. At the moment when the flow through a vessel increases,

éste se dilata. Este fenómeno es el que se conoce como dilatación mediada por el flujo (*flow mediated dilatation* o FMD en sus siglas en inglés). Schretzenmayer¹²² fue el primero en describir esta respuesta fisiológica. Un endotelio INTACTO es crucial para la dilatación mediada por el flujo en las arterias de conducción. En la circulación del antebrazo en los humanos, la respuesta endotelial al flujo depende de las características del flujo como estímulo: la dilatación mediada por flujo tras breves episodios de hiperemia está prácticamente mediada exclusivamente por NO, mientras que la dilatación tras mayores duraciones de hiperemia no se afecta por la inhibición de la síntesis de NO¹²³. La fuerza de cizallamiento induce la fosforilación de un residuo de serina alterando la sensibilidad a los niveles de calcio intracelular de la eNOs, la cual aumenta la producción de NO.¹²⁴ Aunque el FMD no depende únicamente de la formación de NO, sino también de la inactivación de NO y de la sensibilidad a éste por parte de las células musculares lisas subyacentes al endotelio.

2.5 EVALUACIÓN NO INVASIVA DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.

Las enfermedades cardiovasculares constituyen una de las causas más importantes a nivel mundial de discapacidad y muerte prematura. Muchas veces, en el momento de la manifestación de la sintomatología, la enfermedad se encuentra en una fase muy avanzada e incluso irreversible (infarto agudo de miocardio, necrosis isquémica, hemiplejía, por ejemplo). Esto explica la gran importancia y el enorme esfuerzo desarrollado en las últimas décadas a favor

de las estrategias de tipo preventivo: control de los factores de riesgo, cambios en el modo de vida, prevención farmacológica e identificación de los individuos con mayor riesgo. En relación a este último aspecto y teniendo en cuenta algoritmos de estratificación del riesgo más actuales que superen las limitaciones de la clásica medición por factores de riesgo tradicionales y que tengan más en cuenta los recientes conocimientos fisiopatológicos, se vienen desarrollando, en las últimas décadas, técnicas ecográficas no invasivas fácilmente aplicables en la práctica clínica que permiten identificar fases tempranas de la enfermedad o mayor riesgo individual. Entre estas técnicas podemos enumerar, a título de ejemplo, la determinación del grosor de la íntima-media, el índice de presión tobillo-brazo, la determinación de la velocidad de onda del pulso en la aorta y el estudio de la composición de la placa de ateroma en el sector carotideo. Más recientemente se ha propuesto la disfunción endotelial como un claro indicador del riesgo cardiovascular y una técnica asociada a la ecografía, la vasodilatación mediada por el flujo o FMD, como un instrumento útil en la investigación de dicha disfunción.

2.5.1 La vasodilatación mediada por flujo (FMD o “flow mediated dilatation”).

En la actualidad, la vasodilatación mediada por flujo o FMD es el método más utilizado para medir la disfunción endotelial por su alta sensibilidad, por su reproducibilidad y por su carácter no invasivo. Esta técnica se basa en la liberación endotelial de NO y otros factores relajantes derivados del endotelio en respuesta a un aumento de la fuerza de cizallamiento tangencial. En este procedimiento esto se produce cuando el flujo sanguíneo del antebrazo

aumenta durante la hiperemia reactiva que sigue a un breve periodo de isquemia transitoria en los territorios distales. La isquemia se produce mediante un manguito neumático colocado en el antebrazo e hinchado a una presión suprasistólica durante cinco minutos. Al desinflar el manguito, el aumento del flujo resultante da lugar a una fuerza tangencial, que activa la eNOS para que libere NO. El NO en las células del músculo liso vascular produce relajación y, por tanto, vasodilatación. La vasodilatación mediada por flujo se mide como porcentaje de cambio del diámetro de la arteria humeral. Es decir: diferencia porcentual entre la medida del diámetro de la arteria humeral en la situación basal previa al estímulo isquémico y el aumento máximo del diámetro obtenido tras el desinflado del manguito. Celermajer¹¹² y colaboradores la usaron por primera vez basándose en un estudio fisiológico previo de Anderson y Mark.²⁵

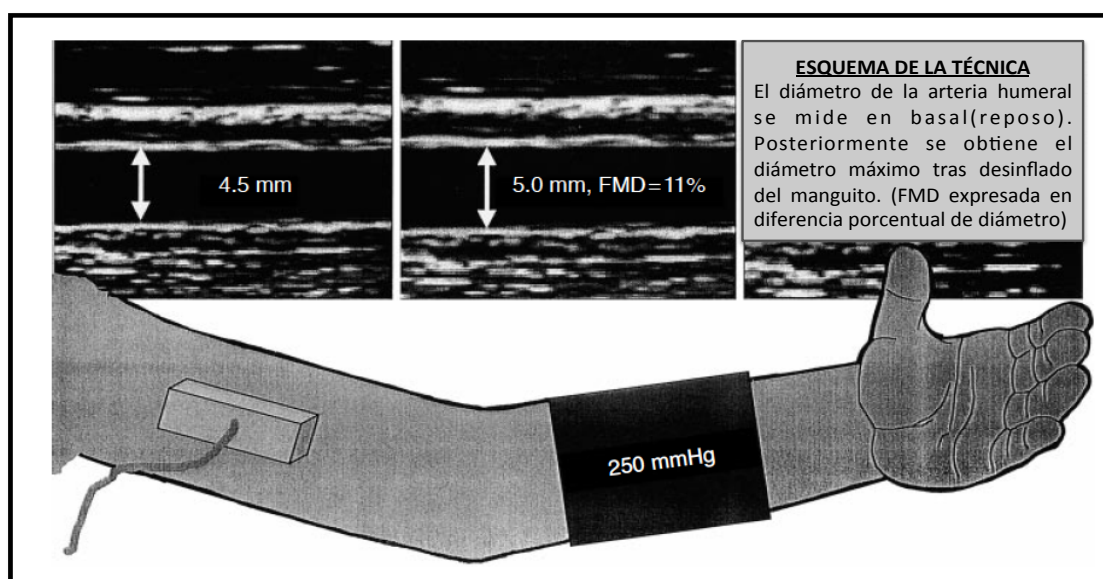
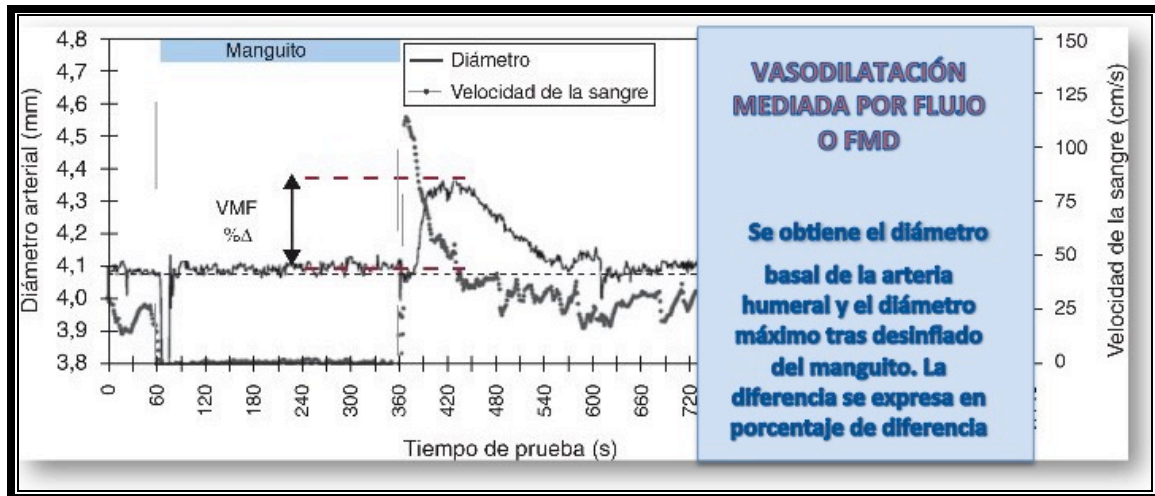


Figura 1. Esquema de la técnica de la vasodilatación mediada por flujo.

Existen ciertas cuestiones metodológicas que deben tenerse en cuenta si se quieren obtener resultados fiables, reproducibles y comparables^{125,126}: A) por un lado, la posición del manguito con respecto a la zona de arteria humeral

analizada. El manguito debe ser posicionado distal a la sonda ecográfica.¹²⁷ En caso contrario, es decir, en el supuesto que se coloque proximal a la zona de insonación ecográfica, la medición de la vasodilatación dependiente del NO se ve afectada por el factor de confusión derivado de la presencia de una vasodilatación isquémica adicional (independiente del NO). B) el tiempo de oclusión del manguito. En este aspecto resulta fundamental y está prácticamente extendida la práctica de aplicar un tiempo de isquemia exacto de cinco minutos para provocar una buena respuesta hiperémica reactiva. C) La medición del diámetro al final de la diástole. D) El registro de la dilatación máxima¹²⁸ y no de la dilatación tras cierto tiempo después del desinflado del manguito. Hacerlo tras un periodo establecido y fijo, por ejemplo un minuto, no detecta la dilatación máxima en muchos individuos. E) Control de los factores ambientales. Aunque se conoce que factores como la temperatura ambiental, el momento del día, la ingestión de alimentos o cafeína o la fase del ciclo menstrual pueden afectar la determinación de la FMD y algunas guías recomiendan neutralizar en lo posible sus efectos, los datos más recientes ponen en evidencia¹²⁹ que esta contribución a la variabilidad de la FMD es relativamente baja y no debe considerarse un factor limitante cuando no es posible alcanzar las condiciones ideales.

Figura 2: Vasodilatación mediada por flujo. Representación numérica y temporal de la técnica.



2.5.2 Valor clínico de la determinación de la vasodilatación mediada por flujo (FMD).

En el campo de la investigación, la vasodilatación mediada por flujo, constituye un instrumento muy valioso y su futura aplicación clínica aún se encuentra en etapas muy primitivas.¹³⁰ En un estudio prospectivo¹³¹ sobre 213 individuos no fumadores entre 45 y 66 años y tras un seguimiento de seis años se observó que la FMD se correlacionaba con la progresión de la enfermedad preclínica en la arteria carótida y mostraba una relación aún más estrecha con dicha progresión que los factores de riesgo convencionales. En prevención secundaria es capaz de aportar valor pronóstico de riesgo cardiovascular futuro y de aparición de eventos en pacientes con isquemia crónica de miembros inferiores, síndrome coronario agudo previo o pacientes sometidos a cirugía vascular.¹³¹⁻¹³³

Enderle¹³⁴ y colaboradores estudiaron 122 pacientes con sospecha de enfermedad coronaria mediante medida de FMD y cateterismo cardiaco. En este estudio, un valor de FMD menor de 4,5% mostró una sensibilidad de 71%, una especificidad de 81% y un valor predictivo positivo del 95% para el diagnóstico de enfermedad coronaria al compararse con la coronariografía. En esos mismos pacientes, un valor deprimido de FMD obtuvo una sensibilidad similar al electrocardiograma de esfuerzo en la detección de enfermedad coronaria pero fue más específico para el diagnóstico que el electrocardiograma de esfuerzo o la clínica de angor pectoris. En otro estudio,¹³⁵ valores de FMD superiores al 10% obtuvieron un valor predictivo negativo de 95% para isquemia detectada mediante imágenes de perfusión miocárdica. Aunque existe una mínima divergencia, todos estos estudios concuerdan en establecer como FMD normal una vasodilatación mediada por flujo del 7 al 10% o superior y aceptan como valor patológico de FMD un valor que oscile entre un 0 y un 5% de FMD expresada en cambio porcentual.

3 JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo aborda el proceso de la supuesta inflamación asociada a la cirugía desde una perspectiva poco contemplada: la importancia del endotelio y su influencia en el binomio curación/enfermedad. Se trata de un problema médico de enorme importancia pero todavía no resuelto. El desarrollo de este estudio permite inaugurar un nuevo planteamiento de examen del fenómeno inflamatorio asociado al proceso quirúrgico desde una óptica novedosa: el uso de técnicas ecográficas que permitan explorar lo acontecido en el endotelio en las primeras veinticuatro horas del paciente intervenido quirúrgicamente.

Las aplicaciones prácticas de las técnicas de imagen asociadas a la ecografía y, más concretamente, al eco-Doppler en nuestros sistemas sanitarios actuales son conocidas y muy valoradas por la gran información morfológica y hemodinámica que proporcionan con la ventaja añadida de ser pruebas no invasivas. El desarrollo del eco-Doppler vascular ha permitido enormes avances en la patología vascular cerebral, en la patología aneurismática, en la isquemia de miembros y en la patología venosa, entre otros campos. La nueva perspectiva planteada en este estudio autoriza la posibilidad de incorporar paulatinamente al *arsenal* clínico una herramienta de investigación experimental como es la medida de la vasodilatación mediada por flujo o FMD. Así ha ocurrido en pasadas décadas con el índice tobillo-brazo, el

estudio eco-Doppler carotídeo y otros avances del eco-doppler vascular que resultan, actualmente, indispensables en el desarrollo de una correcta actividad médica para millones de pacientes.

La idea novedosa, que queremos plantear y estudiar aquí, abre la puerta a una nueva concepción del proceso quirúrgico y de la cicatrización considerando, en su justa medida, el papel de un órgano tan olvidado pero tan fundamental en la homeostasis como es el endotelio. Significa un paso más allá en la concepción fisiopatológica. Y permite que la técnica de la FMD pase de ser únicamente un “instrumento” experimental a un “instrumento” para el diagnóstico y, mejor aún, para el control y la prevención.

Las medidas de la FMD posibilitarían la identificación de los pacientes con mayor riesgo quirúrgico o de complicaciones arterioscleróticas, permitiendo algo tan importante en medicina como es la estratificación del riesgo futuro de los pacientes.

Todo ello, sin olvidar que se trata de una técnica no invasiva, barata y aplicable en todos los centros o servicios que cuenten con un ecógrafo.

Por tanto y tal y como indicamos previamente, identificar y desgranar el papel del endotelio en el proceso inflamatorio que se asocia a todo acto quirúrgico, a través de instrumentos al alcance de la mayoría de los centros sanitarios, nos permitirá un avance extraordinario en la comprensión, en el pronóstico, en la calidad y en el control del acto de la curación en el paciente quirúrgico. El

trabajo aquí presentado pretende evidenciar el fenómeno de la disfunción endotelial tras cirugía mediante técnicas ecográficas y proponer que el inicio de ese camino es posible.

HIPÓTESIS

Hipótesis conceptual

Existe un proceso agresivo (inflamatorio) asociado al acto quirúrgico que distorsiona la función endotelial del tono vascular en la circulación arterial en las horas siguientes a la cirugía.

Hipótesis operacional

Existe un proceso agresivo asociado al acto quirúrgico que distorsiona la función endotelial del tono vascular en la circulación arterial determinada mediante la técnica de vasodilatación mediada por flujo (FMD) en las primeras 24 horas.

Hipótesis estadística

La hipótesis nula es que la agresión asociada al acto quirúrgico no provoca diferencias en la vasodilatación mediada por flujo (FMD expresada en porcentaje de cambio) en las primeras veinticuatro horas. Para establecer la hipótesis alternativa, dada la escasa evidencia científica sobre la modificación en la FMD, no se pudo utilizar ninguna cifra previamente publicada. Se asumió, como razonable, que la FMD disminuiría el 5% a las 6 horas de la cirugía. Por lo tanto, se estableció como hipótesis alternativa que, en los pacientes que son sometidos a cirugía, la FMD disminuye en términos absolutos, al menos, un 5%

(por ejemplo del 12% al 7%). En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula si la diferencia de la FMD pre y posquirúrgica es mayor del 5%. El tamaño muestral (ver más adelante) se ha calculado para contrastar la hipótesis estadística.

OBJETIVOS

- Mediante este estudio se pretende demostrar que existe un proceso inflamatorio/agresivo asociado al acto quirúrgico que distorsiona la función endotelial del tono vascular en la circulación arterial en las primeras veinticuatro horas. Ésta es nuestra hipótesis principal.
- Valorar si existen características inherentes a los pacientes o al proceso quirúrgico que conlleven una mayor disfunción endotelial en el posoperatorio inmediato, entendida ésta como un mayor deterioro de la vasodilatación mediada por flujo (análisis estadístico que permita comparar diferencias en los valores de FMD entre diferentes grupos a lo largo del tiempo).
- Analizar la influencia de las principales citocinas marcadoras de la inflamación con la disfunción endotelial asociada al acto quirúrgico (análisis estadístico de la evolución en el tiempo de los valores de IL-1, IL-6 y TNF en los periodos preoperatorio y tras 6 y 24 horas de la intervención, observando si existen diferencias estadísticamente significativas).
- Determinar si la existencia de valores más altos de citocinas proinflamatorias están asociados a una mayor aparición de complicaciones en las primeras veinticuatro horas tras la cirugía.

4 MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1 Diseño, selección y descripción de los participantes.

Se trata de un estudio observacional, longitudinal y prospectivo. Realizamos un muestreo de casos consecutivos entre los pacientes sometidos a una intervención de tipo traumatológico (reparación de fracturas, laminectomías, etc.) por parte de los servicios de Traumatología y Neurocirugía del hospital “Virgen de la Salud” de Toledo en el periodo del 7 de noviembre de 2012 hasta el 31 de enero de 2013 hasta completar un número total de 44 pacientes. Los sujetos se obtuvieron directamente de entre los pacientes que, cumpliendo los criterios de inclusión y ninguno de exclusión y tras firma de consentimiento informado, formaron parte de la programación de quirófano para intervención quirúrgica en los siguientes siete días.

Criterios de inclusión:

- Edad superior a 18 años.
- Paciente sometido a una intervención de tipo traumatológico durante el periodo de estudio de forma programada.
- Paciente con íntegra capacidad de comprensión.

Criterios de exclusión:

- Intervención de carácter urgente.

- Imposibilidad de realización del seguimiento por cuestiones inherentes al paciente y su patología.
- Pacientes con deterioro cognitivo moderado o grave que les impida la comprensión del estudio.
- Paciente que precise estar hospitalizado durante un periodo inferior a veinticuatro horas.
- Paciente con diagnóstico de artritis reumatoide o enfermedad de Crohn.
- Paciente con terapia anti-TNF o anti-IL-1.

Se recogieron los siguientes datos de sus historias clínicas:

- Nombre.
- Número de historia clínica hospitalaria.
- Edad.
- Sexo.
- Factores de riesgo vascular asociado (tabaquismo, diabetes mellitus, hipertensión arterial, dislipemia, cardiopatía conocida, identificando el tipo de ésta: isquémica u otra).
- Arteriopatía conocida.
- Diagnóstico traumatológico.
- Tipo de intervención realizada.
- Tipo de anestesia realizada.
- Duración de la intervención.
- Incidencias intra y posoperatorias (necesidad de transfusión, etc.)

El Complejo hospitalario de Toledo es un hospital de tercer nivel con 786 camas y un área de referencia de unas 437000 personas. El número total de intervenciones anuales es superior a 25000 con más de 7000 intervenciones programadas con hospitalización anuales según actividad quirúrgica recogida en la última década. El Laboratorio vascular perteneciente al servicio de Cirugía Vascular del Complejo hospitalario de Toledo está acreditado y homologado por el capítulo de *Diagnóstico Vascular No Invasivo* de la *Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular*; en él se realizan una media anual de 4300 exploraciones ecográficas.

4.2 Ética y legislación.

En España, el derecho a la privacidad de los pacientes está protegido por el consentimiento informado, regulado por la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. A todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión se les entregó consentimiento informado oral y escrito (Anexo A) en doble copia. De 44 pacientes, tres decidieron no firmar el consentimiento y no fueron incluidos en este estudio. Todos los procedimientos realizados en este estudio están de acuerdo con las normas éticas de la “Declaración de Helsinki”.

Para el desarrollo de este estudio se ha contado con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) y con la Comisión de Investigación del Complejo hospitalario de Toledo (Anexos B y C).

4.3 Estudio de la FMD (vasodilatación mediada por flujo).

Las exploraciones ecográficas fueron realizadas por personal específicamente entrenado en la técnica (investigador principal) utilizando un ecógrafo APLIO® 80 SSA-770A fabricado por Toshiba Medical Systems y empleando una sonda *Hockey Stick* lineal tipo PLT-1202S multifrecuencia de 7-14MHz. Se optó por esta sonda para el estudio ecográfico de la arteria humeral porque se trata de una sonda de mayor frecuencia y por tanto óptima en un estudio donde prime la sensibilidad al flujo y la resolución frente a la capacidad de penetración.¹³⁶



Figura 3. Ecógrafo y sonda multifrecuencia utilizadas.

La sistemática de la exploración fue la siguiente:

- Los pacientes se colocaron sobre cama o camilla en posición de decúbito supino al menos durante 15 minutos en reposo en una estancia hospitalaria

(sala del Laboratorio vascular o sala de posoperatorio inmediato) con temperatura controlada.

- El paciente quedaba filiado (iniciales y fecha de nacimiento) en el ecógrafo con el fin de que la exploración quedara registrada y los datos obtenidos fueran almacenados en su totalidad. Se iniciaba la exploración mediante el uso de la sonda *Hockey Stick* linear de alta frecuencia con el fin de obtener imágenes longitudinales de la arteria humeral en un punto comprendido entre 5 a 10 centímetros proximal a la fosa antecubital. Dicho punto de análisis era señalado con un lápiz quirúrgico. (Se realizaba en miembro superior derecho a excepción de que la patología, por ejemplo una fractura humeral derecha, limitara el estudio, optando en esos casos por el miembro superior izquierdo.)



Figura 4: Posición de manguito de presión y sonda durante el estudio de la FMD.

- Se obtuvieron imágenes longitudinales en dos dimensiones de la arteria humeral con visibilidad completa del espesor íntima-media y se corregía el

ángulo con la función “angle steer” del ecógrafo para redirigir unos 20 a 30° el ángulo de sonorización para obtener la velocidad pico del flujo.

- Se congelaba la imagen que permitiera valorar el diámetro arterial humeral basal al final de la diástole (electrocardiograma integrado al sistema eco-doppler).

- Se procedía a inflado manual del manguito de presión de un esfigmomanómetro con revisión y calibrado reciente hasta alcanzar una presión superior a la sistólica del paciente. Se usaba la función flujo-color Doppler para confirmar el cese de flujo tras el inflado y se comprobaba la ausencia de pulso distal durante los cinco minutos que el manguito permanecía hinchado. El manguito de presión había sido colocado previamente en el antebrazo, distal al punto de colocación de la sonda ecográfica.

- Tras cinco minutos, se procedía al desinflado total del manguito. Se calculaba la velocidad de pico del flujo en ese momento (primeros quince segundos tras el desinflado, cuando es máximo), ajustando la angulación y mediante captura de pantalla. Y se obtuvieron imágenes longitudinales de la arteria humeral con completa visualización del espesor íntima-media colocando la sonda en la misma localización.

- Las imágenes eran grabadas en secuencias de vídeo de diez segundos de duración de modo correlativo hasta completar tres minutos de grabación con el software del eco-doppler.

- Posteriormente, los datos almacenados eran analizados por un técnico de laboratorio externo al estudio. Mediante el software del ecógrafo se obtuvieron, por un lado, los datos de velocidad pico del flujo pre y post-inflado y, por otro, se realizaban tres medidas seguidas del diámetro arterial con el software de

cálculo del grosor íntima-media, que permitía angular los puntos para ajustarse a una posible sinuosidad del vaso. De las tres medidas tomadas el software permite obtener, automáticamente, la media directa, en milímetros, siendo éste el valor del diámetro del vaso. El análisis de diámetros se realizaba al final de las diástoles.

- Se realizaban dichas mediciones para el estudio basal y para cada una de las secuencias de diez segundos registradas y almacenadas, anotando, de ellas, la dilatación máxima alcanzada en ese periodo de tres minutos tras el desinflado.

- La vasodilatación mediada por el flujo (FMD) se expresa en porcentaje y en cambio absoluto de diámetro según las fórmulas de cálculo:

$$FMD \text{ (\%)} = \frac{\text{diámetro máximo alcanzado tras desinflado} - \text{diámetro basal}}{\text{diámetro basal}} \times 100$$

$$FMD \text{ (mm)} = \text{diámetro máximo alcanzado tras desinflado} - \text{diámetro basal}$$

- Se verificaba que se dejaba una señal con un lápiz marcador quirúrgico con el fin de indicar la zona de arteria humeral analizada en el estudio ecográfico basal y repetir los siguientes estudios sobre la misma zona.

Los análisis de FMD se realizaron en tres ocasiones: periodo preoperatorio, a las 6 y a las 24 horas.

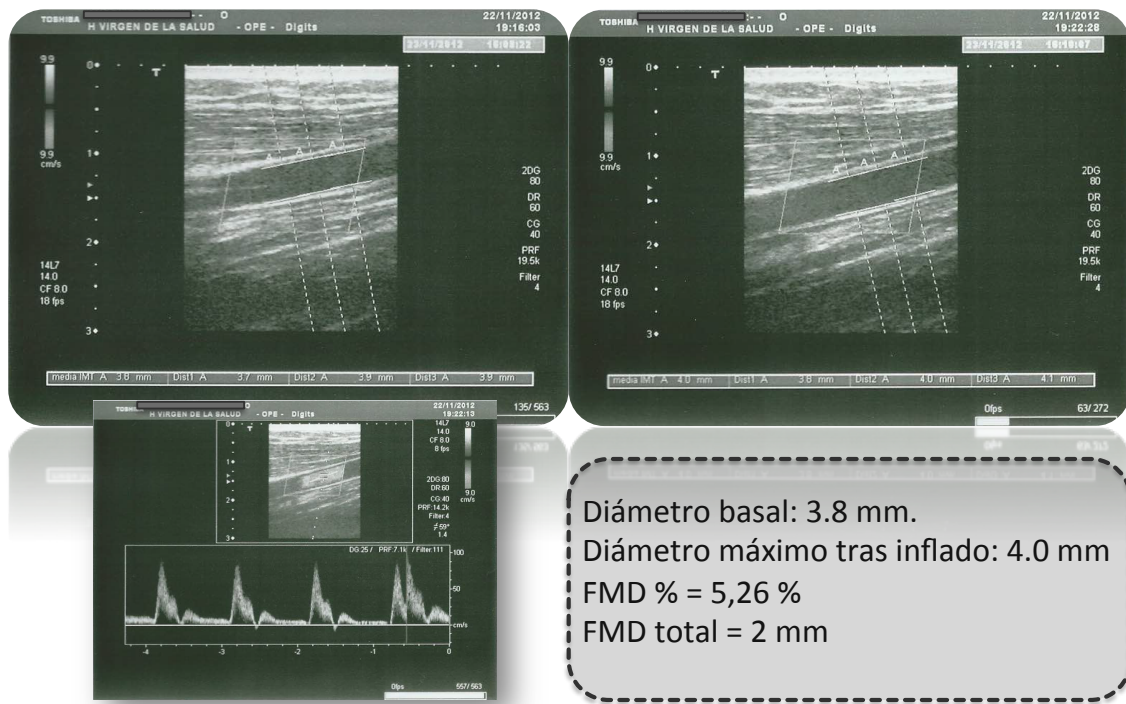


Figura 5: Ejemplo de cálculo de FMD sobre secuencias grabadas, en este caso de un paciente en el periodo posoperatorio a las seis horas de la intervención. (Obsérvese el uso del software de cálculo de grosor íntima-media para realizar tres medidas que disminuyan la posibilidad de error en la medida obteniendo, automáticamente, la media de esas tres). Ejemplo de gráfica de velocidad de flujo para la obtención de la velocidad pico del flujo.

4.4 Medida de citocinas.

Tras la realización de la prueba ecográfica y en el brazo contrario a la exploración, se procedió a extracción venosa por enfermero/a de la planta o del Laboratorio vascular de una cantidad de sangre de entre 5 y 10 centímetros cúbicos para análisis. Las muestras eran transportadas a mano por el investigador principal mediante un recipiente con hielo preparado previamente y llevadas al laboratorio de Bioquímica del Complejo hospitalario de Toledo.

Allí, se procedía a extraer 2 mililitros de sangre para colocación en dos tubos EDTA de 1 ml de suero para congelación y envío para análisis mediante técnica de enzimoimmunoanálisis de interleucina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral α (TNF α). Se colocaba otro mililitro de suero en un tubo con heparina para congelación y envío para análisis mediante técnica de inmunoluminiscencia para obtención de los valores de interleucina 6 (IL-6). Las muestras eran analizadas en un laboratorio externo. Y los resultados remitidos desde allí al laboratorio de Bioquímica del hospital.

Los valores de todas las citocinas eran obtenidos en picogramos por mililitro (pg/ml), siendo los niveles de citocinas séricas normales de 0 a 87 pg/ml para TNF α , de 0 a 15 pg/ml para IL-1 y de 0 a 10 pg/ml para IL-6.

Las extracciones se realizaron, también, en tres ocasiones: periodo preoperatorio, a las 6 y a las 24 horas de la intervención. Por problemas con el laboratorio externo encargado del análisis no se obtuvieron datos completos de 9 de los 41 pacientes del estudio con respecto a sus niveles séricos de citocinas, sí obteniendo datos completos y fiables en 32 de los pacientes que son los que realmente fueron analizados.

4.5 Estadística.

Cálculo del tamaño muestral

Para el cálculo del tamaño muestral se partió de la hipótesis estadística: existe una media de diferencias en el valor de la FMD pre y posquirúrgica del 5%. Para garantizar que esta diferencia se encontraría, en caso de que existiese, se asumió que la media de las diferencias (muestras emparejadas) sería del 5% con una desviación estándar de 10%. Con estas asunciones, sería necesario reclutar aproximadamente a 34 pacientes (número de pares) ($\alpha=0,05$; $\beta=0,2$). Este cálculo se ha realizado con el programa EPIDAT 4.1.¹³⁷ Para garantizar este tamaño muestral, se asumió que podría haber un 10% de pacientes con datos incompletos o pérdidas, por lo que el tamaño muestral final se estimó en 38 pacientes.

Coefficiente de correlación intraclase

Con el fin de valorar previamente la concordancia interobservador, es decir, la consistencia entre dos observadores distintos cuando evalúan mediante eco-Doppler la medida del diámetro de la arteria humeral al final de la diástole, se procedió a analizar una serie de treinta pacientes que cumplieran los criterios de inclusión y exclusión de forma consecutiva por parte de una diplomada universitaria de enfermería acreditada y con más de cuatro años de experiencia en un laboratorio vascular y un cirujano vascular. Se usó el mismo ecógrafo por parte de ambos observadores (APLIO® Modelo 80 SSA-770A fabricado por

Toshiba Medical Systems) y se realizó la técnica de medición tal y como se comenta en el protocolo de estudio, obteniendo el resultado del diámetro en milímetros. Ninguno de ellos conocía los resultados obtenidos por el otro observador en cada uno de los sujetos estudiados. Tras recogida de todas las mediciones se obtuvo el coeficiente de correlación intraclase (CCI) mediante uso del software IBM SPSS 19.0 bajo licencia de IBM (Armonk, Nueva York, Estados Unidos).

Análisis estadístico de los datos

Los datos recogidos fueron grabados en una base de datos en Microsoft Excel[®] donde se realizó la primera depuración de datos. A continuación, se llevó a cabo la recodificación de variables y la creación de nuevas variables (por ejemplo, categorización de variables continuas). La base de datos en Excel, se exportó a SPSS[®] para llevar a cabo el análisis estadístico. Algunas variables fueron recodificadas o creadas en SPSS[®].

Se realizó el análisis descriptivo de cada variable. Las variables categóricas se describen como proporciones (porcentajes). En las variables cuantitativas se comprobó la normalidad o no de su distribución con el test de Kolmogorov Smirnov. Las variables cuantitativas se han descrito con la media y mediana, como estadísticos de centralización, y con la desviación estándar y el rango intercuartílico (Percentil 25 – Percentil 75), como estadísticos de dispersión. Se adjunta además información del valor mínimo y máximo de cada variable continua.

Se han realizado dos tipos de comparaciones: 1) la modificación de determinadas variables cuantitativas (por ejemplo, FMD) en función del momento de su medición: basal (previa a la cirugía), a las 6 horas, y a las 24 horas de la cirugía; y 2) las diferencia de determinadas variables cuantitativas (por ejemplo, FMD) entre grupos (por ejemplo, entre sujetos fumadores o no fumadores).

En el primer tipo de comparaciones (modificación de variables cuantitativas en función del momento de su medición) se ha realizado la comparación de tres variables (medición basal, a las 6 horas y a las 24 horas), por lo que correspondería hacer un análisis de la varianza (ANOVA). Como las muestras no son independientes (son datos pareados) y la distribución resultó no ser normal, se utilizó el test de Friedman para muestras relacionadas sin distribución normal para el ANOVA de dos factores por rangos. Para realizar la comparación entre grupos (0 horas-6 horas; 0 horas-24 horas; 6 horas-24 horas) se utilizó, como test no paramétrico, la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas.

Para el segundo tipo de comparaciones (diferencias de determinadas variables cuantitativas entre dos grupos independientes) se estudió, en primer lugar, la normalidad de la distribución. En caso de que la distribución fuese normal, se ha realizado la comparación mediante el análisis de diferencia de las medias utilizando la t de Student para muestras independientes. En caso de que la distribución no se ajustase a la normalidad, se ha utilizado la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

En todos los contrastes de hipótesis se ha utilizado el contraste a dos colas, un nivel de significación $\alpha=0,05$, y una potencia estadística $(1-\beta)=0,8$. Los análisis estadísticos han sido realizados con SPSS® 19.0.

5 RESULTADOS

5.1 Características basales de los pacientes: variables categóricas.

Tabla 1. Características basales de los pacientes: variables categóricas.		
Variable	N	%
Sexo (N=41)		
Hombre	21	51,22
Mujer	20	48,78
Edad (N=41)		
< 30 años	10	24,39
30 - 50 años	17	41,46
>50 - <65 años	8	19,51
≥ 65 años	6	14,63
Fumador (N=41)		
No	30	73,17
Sí	11	26,83
Diabetes (N=41)		
No	40	97,56
Sí	1	2,44
Hipertensión arterial (N=41)		
No	32	78,05
Sí	9	21,95
Hipercolesterolemia (N=41)		
No	34	82,93
Sí	7	17,07
Enfermedad coronaria (N=41)		
No	40	97,56
Sí	1	2,44
Arteriopatía (N=41)		
No	40	97,56
Sí	1	2,44
Fractura (N=41)		
No	11	26,83
Sí	30	73,17
TNF (N=32)		
Normal	31	96,88
Elevado	1	3,13
IL-1 (N=32)		
Normal	32	100,00
Elevada	0	0,00
IL-6 (N=32)		
Normal	24	75,00
Elevada	8	25,00
FMD relativa (N=41)		
Normal (≥ 5%)	38	92,68
Alterada (<5%)	3	7,32
TNF: Factor de necrosis tumoral; IL: Interleucina; FMD: "flow mediated dilatation" (vasodilatación mediada por flujo).		

En la *tabla 1* se detalla la distribución de características basales de los pacientes del estudio con respecto a las variables categóricas. Éstas vienen expresadas en frecuencia absoluta y porcentaje. De los 41 pacientes estudiados, prácticamente la mitad corresponden a mujeres y la otra mitad a hombres. Once pacientes (26,83%) eran fumadores activos, nueve pacientes (21,95%) eran hipertensos con tratamiento antihipertensivo instaurado y siete de ellos (17,07%) presentaban hipercolesterolemia conocida. El número de pacientes con antecedentes de diabetes, enfermedad coronaria o arteriopatía era mínimo. Treinta de los pacientes (73,17%) habían sufrido algún tipo de fractura (humeral, cadera, radio, tibia, lumbar) que justificara la intervención frente a once pacientes (26,83%) sin fractura asociada (hernia discal, estenosis de canal, displasia de cadera).

Los valores basales de citocinas eran normales para todos los pacientes en el caso de la IL-1 con sólo un paciente con TNF elevado basal, correspondiente a un paciente fumador de 35 años con fractura de húmero izquierdo. Los valores basales de IL-6 se encontraban dentro de los niveles séricos normales en tres cuartas partes de los pacientes. En ocho de ellos (25%), dichos niveles basales se encontraban en cantidades superiores a los normales. De estos pacientes con IL-6 basal elevadas siete pertenecen a fracturas de húmero y un paciente corresponde al diagnóstico de fractura de radio. De este modo, de los ocho pacientes con diagnóstico de fractura de húmero, siete presentaron niveles basales elevados de IL-6 lo que corresponde a un 87,5% de los pacientes con dicho diagnóstico.

Aceptando como valor normal una vasodilatación mediada por flujo igual o superior a 5% en base a los estudios fisiológicos y cardiovasculares realizados previamente y clasificando como patológico un valor menor del 5%, nos encontramos con que sólo tres pacientes (7,32%) presentaban valores de FMD que pudiéramos definir como patológicos previo al momento de la intervención quirúrgica sin que existieran datos basales coincidentes entre los tres (no coincidencia en ninguna de las variables estudiadas: sexo, tabaquismo, grupo de edad, diagnóstico traumatológico, etc.)

5.2 Características basales de los pacientes: variables continuas.

En la *tabla 2* se detalla la distribución de las características basales de los pacientes con respecto a las variables continuas. Éstas vienen expresadas en forma de media, desviación estándar, mediana, rango intercuartílico y valor mínimo y máximo.

Tabla 2. Características basales de los pacientes: variables continuas.								
Variable	N	Media	DE	Mediana	P25 - P75	Mínimo	Máximo	Distribución*
Edad (años)	41	44,8	16,2	44,0	32,5 - 58,5	18	79	Normal
Flujo inicial (m/s)	41	86,0	28,7	85,0	65,0 - 103,0	40,0	185,5	Normal
Flujo post-manguito (m/s)	41	130,94	48,91	120,00	100,1 - 157,5	55,00	280,00	No normal
FMD absoluta (mm)	41	0,51	0,24	0,50	0,40 - 0,60	-0,20	0,90	No normal
FMD relativa (%)	41	15,12	8,36	13,64	9,65 - 19,87	-4,55	30,00	Normal
TNF (pg/ml)	32	19,48	87,95	0,00	0,00 - 6,40	0,00	500,00	No normal
IL-1 (pg/ml)	32	3,50	3,34	3,00	1,10 - 4,40	0,00	12,70	No normal
IL-6 (pg/ml)	32	7,00	7,53	4,95	2,35 - 10,80	1,00	39,50	No normal
N= número de observaciones; DE= desviación estándar; P25-P75= rango intercuartílico. FMD: "flow mediated dilatation" (vasodilatación mediada por flujo); TNF: <i>Tumor necrosis factor</i> ; IL: Interleucina. * Test de Kolmogórov-Smirnov.								
Variable	N	Media	DE	Mediana	P25 - P75	Mínimo	Máximo	Distribución
Tiempo de cirugía (minutos)	41	166,1	76,3	150,0	100 - 212,5	65	380	Normal

5.3 Tipo de cirugía, anestesia y complicaciones posquirúrgicas

Tabla 3. Tipo de cirugía, anestesia, y complicaciones (N=41).		
Variable	N	%
Cirugía		
Acromioplastia	1	2,44
Artroplastia de cadera	3	7,32
Laminectomía	12	29,27
Reducción y fijación de fractura	25	60,98
Anestesia		
General	28	68,29
Raquídea*	13	31,71
Complicaciones		
No	31	75,61
Sí	10	24,39
* Incluye 3 casos de bloqueo anestésico.		

En la *tabla 3* observamos la distribución de los pacientes según el tipo general de cirugía a la que fueron sometidos, el tipo de anestesia, donde 28 pacientes (68,29%) fueron intervenidos bajo anestesia general y 13 pacientes (31,71%) bajo anestesia regional (10 pacientes con anestesia raquídea y tres mediante bloqueo anestésico). Se produjeron complicaciones posoperatorias en 10 pacientes (24,39%) en las primeras veinticuatro horas: cuatro cuadros de fiebre posquirúrgica autolimitados, una dehiscencia de herida quirúrgica, una neuroapraxia de nervio radial y cuatro anemizaciones que precisaron de transfusión de concentrados de hematíes.

5.4 Comparación de la vasodilatación mediada por flujo en porcentaje de cambio (FMD %) basal y a las 6 y 24 horas posquirúrgicas.

Hipótesis principal.

A fin de comparar la vasodilatación mediada por flujo en porcentaje de cambio (FMD %) en los tres periodos estudiados y puesto que se trata de un diseño de estudio en el que los mismos individuos son observados antes y después de una intervención y en evolución en el tiempo, es decir, cuando un mismo individuo es medido en tres momentos diferentes, se procedió a análisis mediante la prueba de Friedman puesto que la distribución de la variable “FMD %” tuvo distribución normal en el momento basal pero no así a las 6 y 24 horas posquirúrgicas tras test de Kolmogórov-Smirnov como se puede ver en la *tabla 4*. Tras la obtención de significancia estadística, se realizaron pruebas de rangos con signos de Wilcoxon para muestras relacionadas para buscar la relación que generaba la significancia global. Es preciso, también, tener en cuenta la direccionalidad del contraste. Asumimos un contraste bilateral o de dos colas, es decir, que puede haber diferencias, pero no delimitando si éstas se situarán por encima o por debajo de los valores asignados en la hipótesis nula.

Tabla 4. Comparación de la FMD relativa (%) basal y a las 6 y 24 horas posquirúrgicas.			
	FMD (%) basal (0 h)	FMD (%) post-cirugía (6 h)	FMD (%) post-cirugía (24 h)
N	41	41	41
Distribución*	Normal	No normal	No normal
Media	15,12	5,79	13,63
Desviación estándar	8,36	5,32	8,33
Mediana	13,64	5,26	11,76
Percentil 25	9,65	2,82	9,38
Percentil 75	19,87	8,60	16,90
Contraste de hipótesis:			
Diferencias entre grupos: $p < 0,000$.**			
Diferencia entre FMD basal (0h) y FMD post-cirugía (6 h): $p < 0,000$ ***			
Diferencia entre FMD basal (0h) y FMD post-cirugía (24 h): $p = 0,104$ ***			
Diferencia entre FMD post-cirugía (6 h) y FMD post-cirugía (24 h): $p < 0,000$ ***			
FMD: "Flow mediated dilatation" (vasodilatación mediada por flujo).			
* Test de Kolmogórov-Smirnov.			
** ANOVA: prueba de Friedman para muestras relacionadas sin distribución normal para análisis de la varianza de dos factores por rangos.			
*** Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas.			

La FMD en porcentaje de cambio en el momento previo a la cirugía (media: 15,12; mediana: 13,64) disminuyó a las 6 horas de la cirugía (media: 5,79; mediana: 5,26) para ascender de nuevo en valores a las 24 horas de la cirugía (media: 13,63; mediana 11,86), siendo estadísticamente significativo el descenso entre la determinación basal y la de las 6 horas ($p < 0,000$) y el ascenso entre la determinación de las 6 horas y la de las 24 horas ($p < 0,000$), pero no el cambio entre la determinación basal y la de las 24 horas ($p = 0,104$). En vista de los datos obtenidos y recordando la hipótesis principal del estudio que indicaba que la FMD % disminuye tras la cirugía, se observa que la FMD%

a las 6 horas comparada con la FMD % basal disminuye el valor de 9,33, que es mayor de 5, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. Es decir, que existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de FMD % basales y a las 6 horas. También se observó que los valores de FMD % a las 6 horas aumentan posteriormente de forma estadísticamente significativa, de manera que existe una recuperación de los valores de FMD en porcentaje de cambio a las 24 horas tras la caída observada a las 6 horas. Finalmente, dado que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales y los correspondientes a las 24 horas posquirúrgicas, se puede concluir que la FMD % se recuperó a las 24 horas de la intervención quirúrgica.

Esta caída de la FMD % a las 6 horas con recuperación casi total a las 24 horas del procedimiento quirúrgico se puede visualizar con claridad en el siguiente gráfico (figura 6), donde se observan los valores de FMD%, en el eje de ordenadas, a lo largo de los tres periodos de estudio (eje de abscisas).

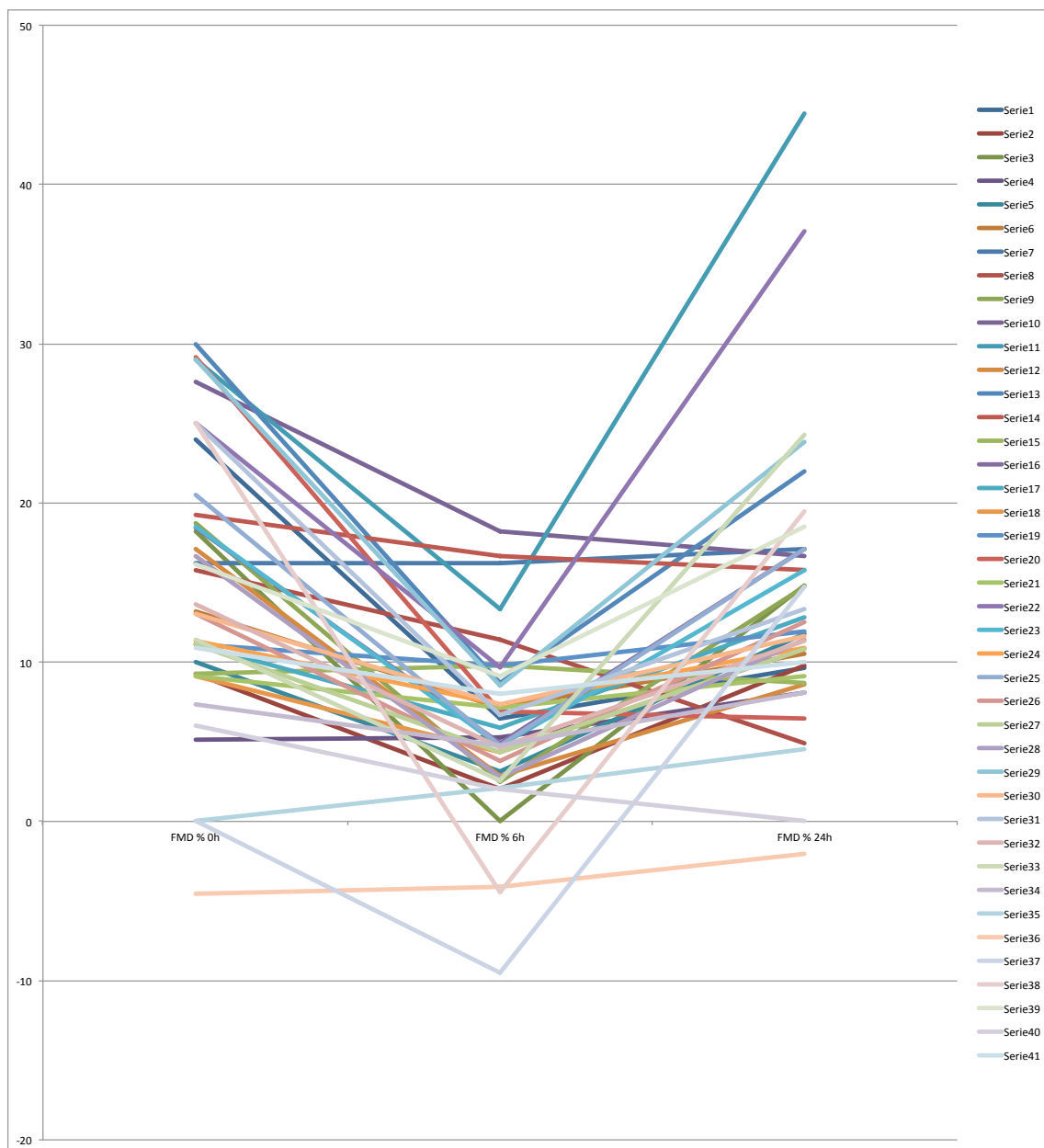


Figura 6: Gráfico con los valores de FMD en porcentaje de cambio por paciente durante los tres periodos (representación lineal)

Del mismo modo, el siguiente gráfico con representación radial de los tres periodos de medida de la FMD en porcentaje nos permite visualizar claramente esa “contracción” de los valores de la FMD% a las seis horas del evento quirúrgico para prácticamente todos los casos y como las representaciones gráficas radiales obtenidas de los valores de FMD% previo y a las veinticuatro horas de la cirugía son superponibles poco más o menos.

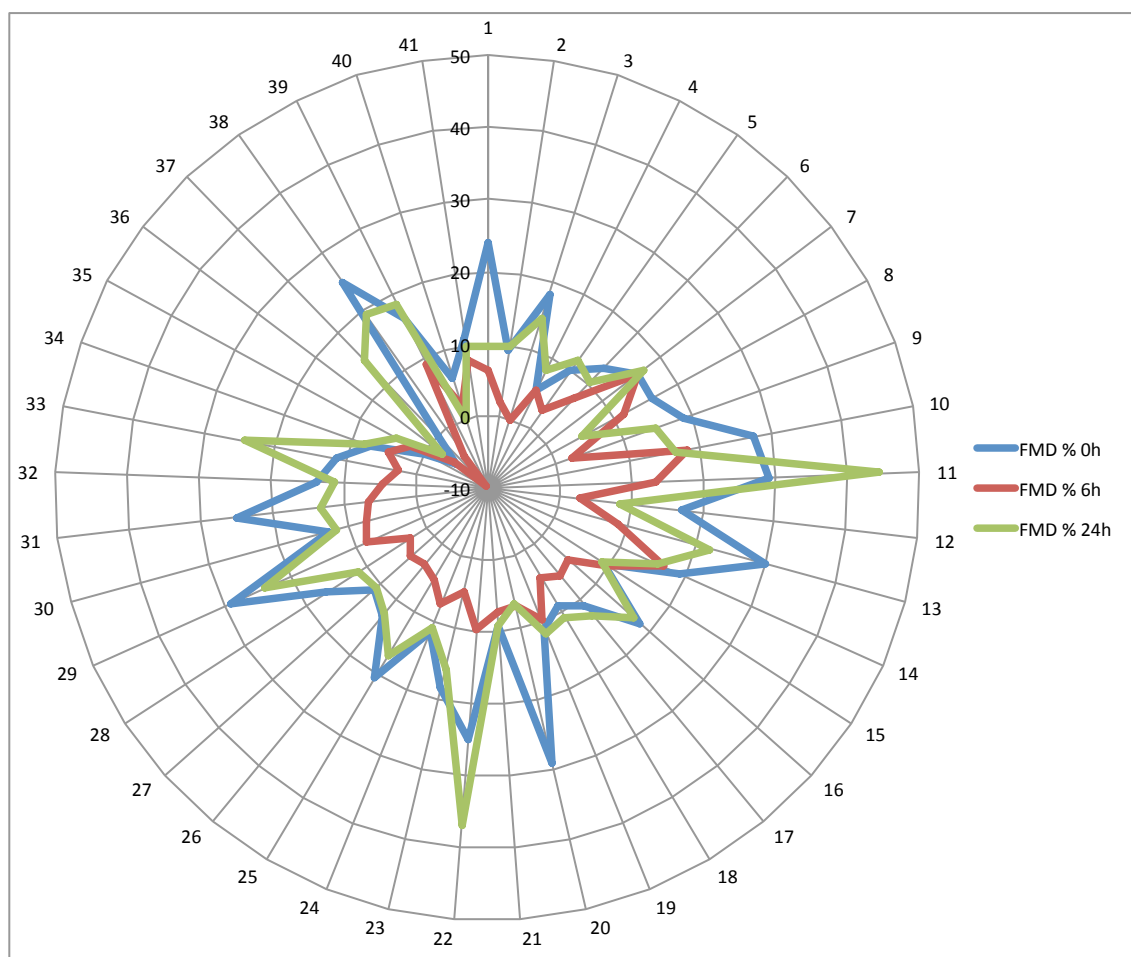


Figura 7: Gráfico de representación radial de la FMD % en los tres periodos para los 41 pacientes.

5.5 Comparación de la FMD absoluta basal y a las 6 y 24 horas posquirúrgicas.

De idéntico modo que en el apartado anterior, pero ahora considerando los valores absolutos de la diferencia de la vasodilatación mediada por flujo en el periodo basal, a las 6 y a las 24 horas tras el procedimiento quirúrgico, se procedió a análisis comparativo mediante las mismas pruebas estadísticas, observando las mismas conclusiones que para la diferencia porcentual: no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los periodos basal y 24 horas tras la intervención pero sí existen diferencias y son estadísticamente significativas al comparar el periodo basal con el de las 6 horas tras la cirugía y éste último con el periodo de 24 horas postprocedimiento.

Tabla 5. Comparación de la FMD absoluta basal y a las 6 y 24 horas posquirúrgicas.			
	FMD (mm) basal (0 h)	FMD (mm) post-cirugía (6 h)	FMD (mm) post-cirugía (24 h)
N	41	41	41
Distribución*	No normal	No normal	No normal
Media	0,51	0,21	0,47
Desviación estándar	0,24	0,19	0,25
Mediana	0,50	0,20	0,40
Percentil 25	0,40	0,10	0,30
Percentil 75	0,60	0,30	0,55
Contraste de hipótesis:			
Diferencias entre grupos: $p < 0,000$.**			
Diferencia entre FMD basal (0h) y FMD post-cirugía (6 h): $p < 0,000$ ***			
Diferencia entre FMD basal (0h) y FMD post-cirugía (24 h): $p = 0,084$ ***			
Diferencia entre FMD post-cirugía (6 h) y FMD post-cirugía (24 h): $p < 0,000$ ***			
FMD: "Flow mediated dilatation" (vasodilatación mediada por flujo).			
* Test de Kolmogórov-Smirnov.			
** ANOVA: prueba de Friedman para muestras relacionadas sin distribución normal para análisis de la varianza de dos factores por rangos.			
*** Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas.			

La representación gráfica de esta diferencia por individuos se visualiza a través de estos gráficos de igual modo que en el apartado anterior donde el eje de ordenadas representa el valor de FMD total.

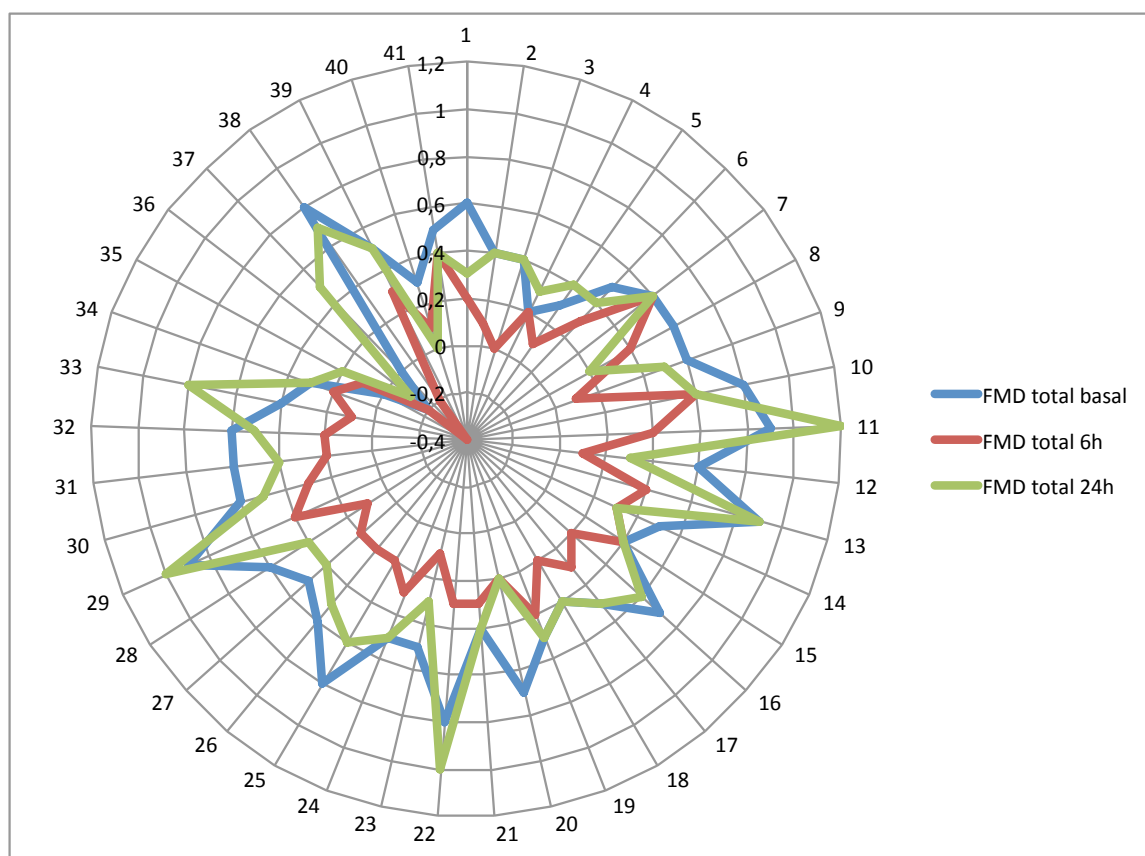


Figura 8: Gráfico de representación radial de la FMD % en los tres periodos para los 41 pacientes.

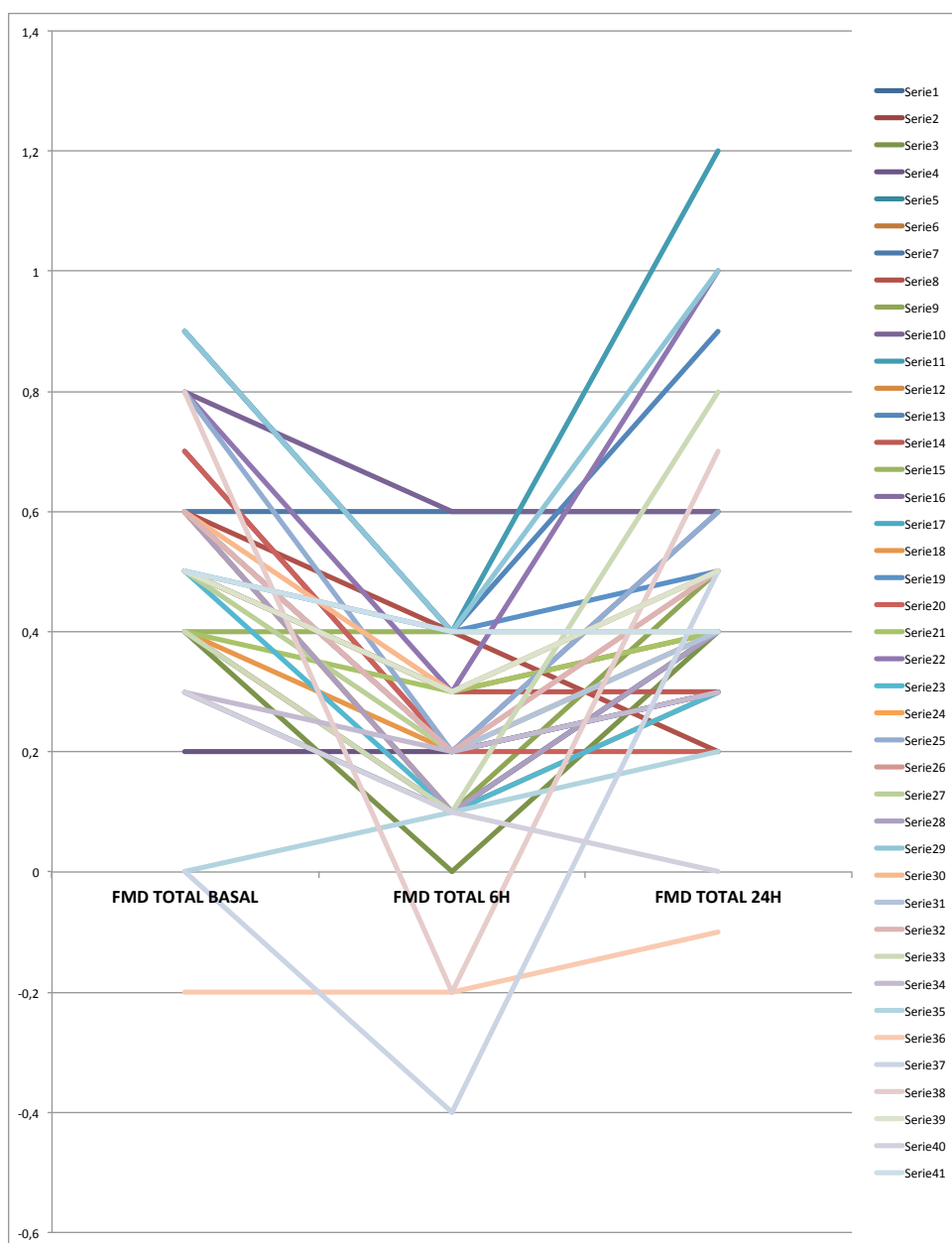


Figura 9: Gráfico de representación lineal de la FMD total en los tres periodos para el total de pacientes. Eje de abscisas representando los tres periodos estudiados, FMD en cambio absoluto representado en el eje de ordenadas.

Se observa con claridad que en el periodo posoperatorio correspondiente a las 6 horas tras el procedimiento, existió una disminución clara con respecto al valor de la FMD en valor absoluto y que a las 24 horas asistimos a una recuperación a valores similares a los basales.

5.6 Comparación del pico de velocidad de flujo inicial (periodo preoperatorio y posquirúrgico a las 6 y a las 24 horas).

Tabla 6. Comparación del flujo inicial basal y a las 6 y 24 horas post-cirugía.			
	Flujo inicial (cm/s) basal (0 h)	Flujo inicial (cm/s) post-cirugía (6 h)	Flujo inicial (cm/s) post-cirugía (24 h)
N	41	41	41
Distribución*	Normal	No normal	No normal
Media	86,04	89,59	94,61
Desviación estándar	28,71	32,15	40,14
Mediana	85,00	80,00	80,40
Percentil 25	65,00	65,00	65,00
Percentil 75	103,05	110,30	105,00
Contraste de hipótesis:			
Diferencias entre grupos: $p=0,491^{**}$			
Diferencia entre flujo inicial basal (0h) y flujo inicial post-cirugía (6 h): $p=0,807^{***}$			
Diferencia entre flujo inicial basal (0h) y flujo inicial post-cirugía (24 h): $p=0,133^{***}$			
Diferencia entre flujo inicial post-cirugía (6 h) y flujo inicial post-cirugía (24 h): $p=0,424^{***}$			
* Test de Kolmogórov-Smirnov.			
** ANOVA: prueba de Friedman para muestras relacionadas sin distribución normal para análisis de la varianza de dos factores por rangos.			
*** Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas.			

Como se observa en la *tabla número 6*, al comparar los flujos iniciales en la arteria humeral, o sea previos al inflado del manguito de presión, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los flujos en los tres periodos estudiados, por lo que no podemos afirmar que estos picos de velocidad eran diferentes en estos tres periodos.

5.7 Comparación del pico de velocidad de flujo tras desinflado del manguito (periodo preoperatorio y posquirúrgico a las 6 y a las 24 horas).

Tabla 7 Comparación del flujo post-manguito basal y a las 6 y 24 horas post-cirugía.			
	Flujo post-manguito (cm/s) basal (0h)	Flujo post-manguito (cm/s) post-cirugía (6 h)	Flujo post-manguito (cm/s) post-cirugía (24 h)
N	41	41	41
Distribución*	No normal	Normal	Normal
Media	130,94	144,25	142,76
Desviación estándar	48,91	46,27	49,55
Mediana	120,00	140,50	138,00
Percentil 25	100,15	107,50	99,35
Percentil 75	157,50	176,60	190,00
Contraste de hipótesis:			
Diferencias entre grupos: $p=0,066^{**}$			
Diferencia entre flujo post-manguito basal (0h) y flujo post-manguito post-cirugía (6 h): $p=0,026^{***}$			
Diferencia entre flujo post-manguito basal (0h) y flujo post-manguito post-cirugía (24 h): $p=0,088^{***}$			
Diferencia entre flujo post-manguito post-cirugía (6 h) y flujo post-manguito post-cirugía (24 h): $p=0,824^{***}$ [a]			
* Test de Kolmogórov-Smirnov.			
** ANOVA: prueba de Friedman para muestras relacionadas sin distribución normal para análisis de la varianza de dos factores por rangos.			
*** Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas.			
[a] Como ambas muestras tienen distribución normal, también se realizó la comparación con la t de Student para muestras pareadas ($p=0,870$).			

Con respecto a las velocidades pico de los flujos tras desinflado del manguito para la realización de la técnica de vasodilatación mediada por flujo, sí observamos diferencias significativas que consistieron en una diferencia, aunque mínima si observamos los valores de media y desviación estándar de ambos grupos entre el periodo basal y el de las seis horas, siendo la media del periodo basal de 130,94 y la desviación estándar de 48,91 y la de las 6 horas de 144,25 y desviación estándar de 46,27. No existieron diferencias significativas estadísticamente entre los picos de velocidad basal y a las 24 horas y entre los de las 6 horas y los de las 24 horas.

5.8 Niveles séricos de factor de necrosis tumoral (TNF) en situación basal y a las 6 y 24 horas posquirúrgicas.

Tabla 8. Comparación de los niveles de TNF en suero en situación basal y a las 6 horas y 24 horas post-cirugía.

	TNF (pg/ml) basal (0 h)	TNF (pg/ml) post-cirugía (6 h)	TNF (pg/ml) post-cirugía (24 h)
N	32	32	32
Distribución*	No normal	No normal	No normal
Media	19,48	18,56	13,77
Desviación estándar	87,95	69,94	58,43
Mediana	0,00	0,00	0,00
Percentil 25	0,00	0,00	0,00
Percentil 75	6,40	8,00	4,80
Contraste de hipótesis:			
Diferencias entre grupos: $p=0,043^{**}$			
Diferencia entre FMD basal (0h) y FMD post-cirugía (6 h): $p=0,469^{***}$			
Diferencia entre FMD basal (0h) y FMD post-cirugía (24 h): $p=0,690^{***}$			
Diferencia entre FMD post-cirugía (6 h) y FMD post-cirugía (24 h): $p=0,011^{***}$			
TNF: Tumor necrosis factor.			
* Test de Kolmogórov-Smirnov.			
** ANOVA: prueba de Friedman para muestras relacionadas sin distribución normal para análisis de la varianza de dos factores por rangos.			
*** Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas.			

Al comparar los niveles de TNF en estos tres periodos observamos que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de TNF en el periodo basal y a las 6 horas tras la cirugía como tampoco existen diferencias estadísticamente significativas entre el periodo basal y el correspondiente a las 24 horas posquirúrgicas. Al comparar el periodo

posquirúrgico a las 6 horas con el correspondiente a las 24 horas sí se observa una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles, con una disminución de 4,8 pg/ml de media. De modo que aunque sólo es estadísticamente significativa la disminución de los valores séricos de TNF en el periodo final en comparación con el de las 6 horas, sí podemos afirmar que no se observa la existencia de un incremento apreciado de esta sustancia en sangre en los periodos posquirúrgicos con respecto al periodo preoperatorio.

5.9 Niveles séricos de factor de interleucina 1 (IL-1) en situación basal y a las 6 y 24 horas posquirúrgicas.

Tabla 9. Comparación de los niveles de IL-1 en suero en situación basal y a las 6 horas y 24 horas post-cirugía.			
	IL-1 (pg/ml) basal (0 h)	IL-1 (pg/ml) post-cirugía (6 h)	IL-1 (pg/ml) post-cirugía (24 h)
N	32	32	32
Distribución*	No normal	No normal	No normal
Media	3,50	1,63	3,28
Desviación estándar	3,34	1,52	4,81
Mediana	3,00	1,55	1,40
Percentil 25	1,10	0,40	0,40
Percentil 75	4,40	2,40	3,90
Contraste de hipótesis:			
Diferencias entre grupos: p=0,001**			
Diferencia entre IL-1 basal (0h) y IL-1 post-cirugía (6 h): p<0,000***			
Diferencia entre IL-1 basal (0h) y IL-1 post-cirugía (24 h): p=0,151***			
Diferencia entre IL-1 post-cirugía (6 h) y IL-1 post-cirugía (24 h): p=0,019***			
IL: Interleucina.			
* Test de Kolmogórov-Smirnov.			
** ANOVA: prueba de Friedman para muestras relacionadas sin distribución normal para análisis de la varianza de dos factores por rangos.			
*** Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas.			

En este apartado debemos destacar que existe una disminución de IL-1 en el corriente sanguíneo en el periodo correspondiente a las seis horas posquirúrgicas con respecto a su valor preoperatorio y a los niveles alcanzados a las 24 horas posquirúrgicas donde se observa un aumento a valores similares a los basales. Ambas diferencias son estadísticamente significativas.

5.10 Niveles séricos de factor de interleucina 6 (IL-6) en situación basal y a las 6 y 24 horas posquirúrgicas.

Tabla 10. Comparación de los niveles de IL-6 en suero en situación basal y a las 6 horas y 24 horas post-cirugía.			
	IL-6 (pg/ml) basal (0 h)	IL-6 (pg/ml) post-cirugía (6 h)	IL-6 (pg/ml) post-cirugía (24 h)
N	32	32	32
Distribución*	No normal	No normal	No normal
Media	7,00	34,19	60,78
Desviación estándar	7,53	26,28	50,32
Mediana	4,95	31,40	39,10
Percentil 25	2,35	15,50	19,48
Percentil 75	10,80	36,70	99,00
Contraste de hipótesis:			
Diferencias entre grupos: $p < 0,000^{**}$			
Diferencia entre IL-6 basal (0h) y IL-6 post-cirugía (6 h): $p < 0,000^{***}$			
Diferencia entre IL-6 basal (0h) y IL-6 post-cirugía (24 h): $p < 0,000^{***}$			
Diferencia entre IL-6 post-cirugía (6 h) y IL-6 post-cirugía (24 h): $p < 0,000^{***}$			
IL: Interleucina.			
* Test de Kolmogórov-Smirnov.			
** ANOVA: prueba de Friedman para muestras relacionadas sin distribución normal para análisis de la varianza de dos factores por rangos.			
*** Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas.			

A diferencia de lo ocurrido con las otras dos citocinas proinflamatorias, lo observado en los niveles de IL-6 en sangre es un aumento progresivo en el tiempo de los valores séricos de IL-6. Dichas diferencias son estadísticamente significativas. En el siguiente gráfico podemos ver la evolución visual de dichos aumentos. Los valores más elevados de la serie a las 6 y a las 24 horas no se relacionan por diagnóstico, ni antecedentes, ni tipo de procedimiento, ni tipo de anestesia practicada ni duración total de la cirugía, aunque sí corresponden con los pacientes que sufrieron complicaciones posquirúrgicas inmediatas.

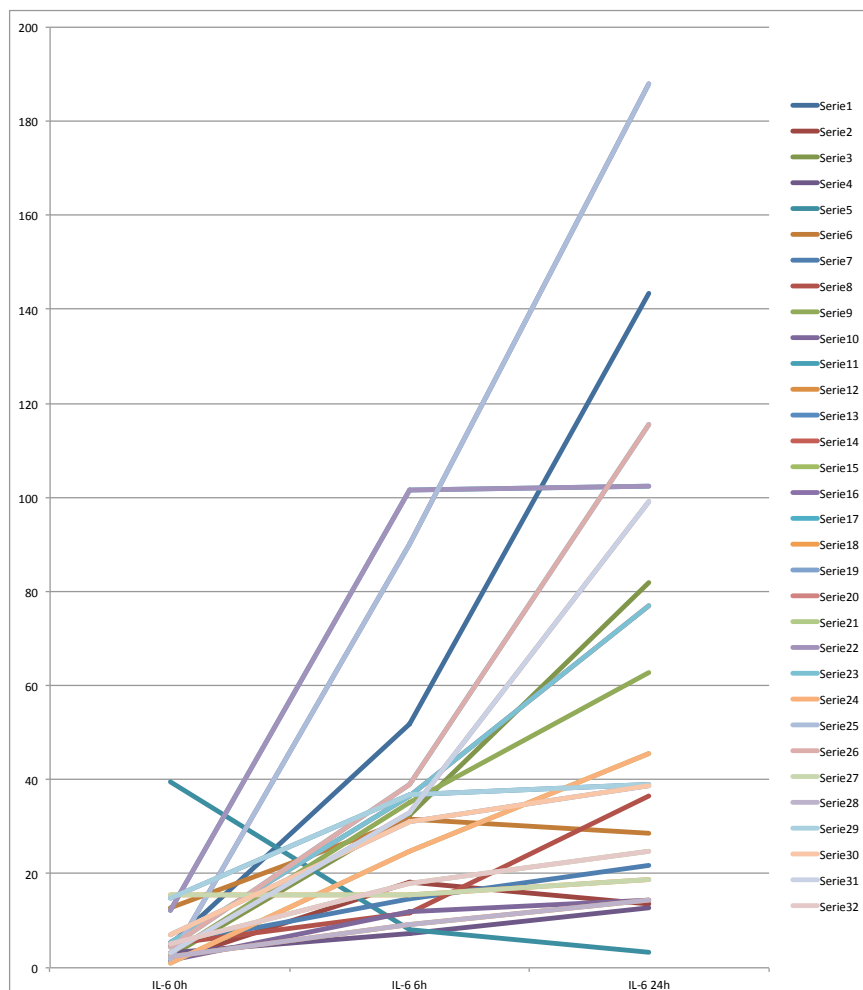


Figura 10. Evolución gráfica de los niveles de IL-6 en el tiempo por paciente. En el eje de ordenadas se representan los niveles séricos de IL-6 en pg/ml.

5.11 Relación de la vasodilatación mediada por flujo con las características basales de los pacientes.

En las *tablas 11, 12, 13 y 14* se analiza la relación existente entre la vasodilatación mediada por flujo expresada en porcentaje de cambio (FMD %) y las características basales de los pacientes, obviando del análisis aquellas condiciones en las que, por mantener un número exiguo de individuos en alguno de los dos grupos, no fue posible realizar una comparación fiable. Este es el caso, por ejemplo de la variable correspondiente a la diabetes mellitus, puesto que sólo un paciente cumplía dicha condición frente a cuarenta no diabéticos, haciendo imposible un estudio estadístico de las posibles similitudes o diferencias encontradas.

Tabla 11. Comparación de la FMD relativa (%) basal, a las 6, y 24 horas post-cirugía entre fumadores y no fumadores.											
Medición de la FMD	FMD relativa (%)										p
	Fumador (N=11)					No fumador (N=30)					
	Media	DE	Mediana	P-25	P-75	Media	DE	Mediana	P-25	P-75	
Basal (0 h)	13,28	10,63	11,11	9,09	19,23	15,80	7,46	15,96	11,11	20,51	0,399 *
Post-cirugía (6 h)	5,92	5,08	4,76	4,35	8,51	5,75	5,48	5,57	2,78	9,09	0,965 **
Post-cirugía (24 h)	11,99	7,32	10,81	9,09	15,79	14,23	8,70	12,20	9,68	17,14	0,552 **
FMD: “flow mediated dilatation” (vasodilatación mediada por flujo).											
N= número de observaciones; DE= desviación estándar; P-25: Percentil 25; P-75: Percentil 75.											
* t de Student para muestras independientes (contraste a dos colas) con distribución normal (test de Kolmogórov-Smirnov).											
** U de Mann-Whitney para muestras independientes. Distribución no normal (test de Kolmogórov-Smirnov).											

Tabla 12. Comparación de la FMD relativa (%) basal, a las 6, y 24 horas post-cirugía entre hipertensos y no hipertensos											
Medición de la FMD	FMD relativa (%)										p
	Hipertensos (N=9)					No hipertensos (N=32)					
	Media	DE	Mediana	P-25	P-75	Media	DE	Mediana	P-25	P-75	
Basal (0 h)	15,80	8,55	16,67	15,79	18,75	14,93	8,44	12,24	9,30	19,87	0,787 *
Post-cirugía (6 h)	4,54	6,70	2,86	2,50	7,14	6,15	4,93	5,57	4,06	8,60	0,359 **
Post-cirugía (24 h)	10,48	6,48	10,53	8,57	14,71	14,52	8,66	12,20	9,88	16,90	0,255 **
FMD: “flow mediated dilatation” (vasodilatación mediada por flujo).											
N= número de observaciones; DE= desviación estándar; P-25: Percentil 25; P-75: Percentil 75.											
* t de Student para muestras independientes (contraste a dos colas) con distribución normal (test de Kolmogórov-Smirnov).											
** U de Mann-Whitney para muestras independientes. Distribución no normal (test de Kolmogórov-Smirnov).											

Tabla 13. Comparación de la FMD relativa (%) basal, a las 6, y 24 horas post-cirugía entre pacientes con y sin hipercolesterolemia.												
Medición de la FMD	FMD relativa (%)										p	
	Hipercolesterolemia (N=7)					No hipercolesterolemia (N=34)						
	Media	DE	Mediana	P-25	P-75	Media	DE	Mediana	P-25	P-75		
Basal (0 h)	21,80	5,19	24,00	16,67	25,00	13,74	8,27	12,24	9,30	18,52	0,018	*
Post-cirugía (6 h)	6,01	6,14	6,45	2,78	11,43	5,75	5,23	5,07	3,12	8,00	0,799	**
Post-cirugía (24 h)	19,35	15,41	11,43	8,57	37,04	12,45	5,70	11,83	9,76	15,79	0,697	**
FMD: "flow mediated dilatation" (vasodilatación mediada por flujo).												
N= número de observaciones; DE= desviación estándar; P-25: Percentil 25; P-75: Percentil 75.												
* t de Student para muestras independientes (contraste a dos colas) con distribución normal (test de Kolmogórov-Smirnov).												
** U de Mann-Whitney para muestras independientes. Distribución no normal (test de Kolmogórov-Smirnov).												

Se observa como no existieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tres periodos al comparar los fumadores con los no fumadores, los pacientes hipertensos con los no hipertensos y los pacientes con hipercolesterolemia con los pacientes sin dicha dislipemia asociada a excepción del periodo previo a la intervención en estos últimos pacientes. En este caso, observamos valores mayores de FMD en los pacientes hipercolesterolémicos con respecto a los privados de dicha condición, con diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 14. Comparación de la FMD relativa (%) basal, a las 6, y 24 horas post-cirugía entre pacientes con y sin fractura											
Medición de la FMD	FMD relativa (%)										p
	Con fractura (N=11)					Sin fractura (N=30)					
	Media	DE	Mediana	P-25	P-75	Media	DE	Mediana	P-25	P-75	
Basal (0 h)	16,01	8,36	13,40	11,11	24,00	12,69	8,26	15,79	7,32	17,14	0,266 *
Post-cirugía (6 h)	5,88	4,31	6,17	4,35	8,51	5,57	7,68	2,86	2,08	11,43	0,513 **
Post-cirugía (24 h)	14,61	9,23	12,20	10,53	17,14	10,96	4,40	10,00	8,11	14,71	0,156 **
FMD: “flow mediated dilatation” (vasodilatación mediada por flujo).											
N= número de observaciones; DE= desviación estándar; P-25: Percentil 25; P-75: Percentil 75.											
** t de Student para muestras independientes (contraste a dos colas) con distribución normal (test de Kolmogórov-Smirnov).											
* U de Mann-Whitney para muestras independientes. Distribución no normal (test de Kolmogórov-Smirnov).											

Con respecto a los pacientes con fractura o no, no existieron diferencias en los valores de FMD al comparar ambos grupos con motivo quirúrgico diverso en los tres periodos estudiados.

5.12 Relación de la vasodilatación mediada por flujo con las características inherentes al proceso quirúrgico.

Analizamos a continuación la relación existente entre la ausencia o presencia de complicaciones, el tipo de anestesia, general o regional y la duración de la intervención con respecto a los valores observados de vasodilatación mediada por flujo, entendiendo que el verdadero interés de estas variables asociadas al procedimiento se deberían encontrar en diferencias en los periodos posquirúrgicos, sirviendo los valores basales para delimitar que los grupos eran comparables en un principio. Así pues, en las *tablas 15 y 16*, se observa como no existieron diferencias estadísticamente significativas en los valores de FMD en los tres periodos estudiados entre los pacientes en razón de la aparición o no de complicaciones posquirúrgicas inmediatas ni en virtud del tipo de anestesia a la que fueron sometidos.

Tabla 15. Comparación de la FMD relativa (%) basal, a las 6, y 24 horas post-cirugía entre pacientes que han tenido o no complicaciones quirúrgicas											
Medición de la FMD	FMD relativa (%)										p
	Con complicaciones (N=10)					Sin complicaciones (N=31)					
	Media	DE	Mediana	P-25	P-75	Media	DE	Mediana	P-25	P-75	
Basal (0 h)	17,65	6,95	18,35	11,11	24,00	14,30	8,71	13,16	9,30	18,75	0,276 *
Post-cirugía (6 h)	6,69	5,14	5,32	3,77	9,68	5,50	5,42	5,26	2,78	8,51	0,940 **
Post-cirugía (24 h)	18,34	12,14	13,82	10,81	15,79	12,11	6,20	11,43	8,57	17,14	0,190 **
FMD: “flow mediated dilatation” (vasodilatación mediada por flujo).											
N= número de observaciones; DE= desviación estándar; P-25: Percentil 25; P-75: Percentil 75.											
* t de Student para muestras independientes (contraste a dos colas) con distribución normal (test de Kolmogórov-Smirnov).											
** U de Mann-Whitney para muestras independientes. Distribución no normal (test de Kolmogórov-Smirnov).											

Tabla 16. Comparación de la FMD relativa (%) basal, a las 6, y 24 horas post-cirugía según el tipo de anestesia.												
Medición de la FMD	FMD relativa (%)										p	
	Anestesia general (N=29)					Anestesia raquídea* (N=13)						
	Media	DE	Mediana	P-25	P-75	Media	DE	Mediana	P-25	P-75		
Basal (0 h)	14,85	7,30	14,71	9,30	18,63	15,70	10,62	13,04	11,11	25,00	0,765	**
Post-cirugía (6 h)	6,37	4,91	4,82	2,82	8,60	4,56	6,12	6,45	3,12	7,32	0,793	***
Post-cirugía (24 h)	12,85	5,87	11,12	8,89	17,14	15,31	12,21	12,50	11,63	14,71	0,688	***
FMD: "flow mediated dilatation" (vasodilatación mediada por flujo).												
N= número de observaciones; DE= desviación estándar; P-25: Percentil 25; P-75: Percentil 75.												
* Incluye 3 casos de bloqueo anestésico.												
** t de Student para muestras independientes (contraste a dos colas) con distribución normal (test de Kolmogórov-Smirnov).												
*** U de Mann-Whitney para muestras independientes. Distribución no normal (test de Kolmogórov-Smirnov).												

Con respecto a las características relativas a la duración de la cirugía, recordaremos, de nuevo, aquí los datos de distribución de esta variable continua en nuestros pacientes, expresados en forma de media, desviación estándar (DE), mediana y rango intercuartílico (P25-P75), con el valor mínimo y máximo de tiempo quirúrgico encontrados en la serie.

Variable	N	Media	DE	Mediana	P25 - P75	Mínimo	Máximo
Tiempo de cirugía (minutos)	41	166,1	76,3	150,0	100 - 212,5	65	380

Con respecto a esta variable, al relacionarla con la vasodilatación mediada por flujo y dividiendo los procedimientos a partir del valor correspondiente a la mediana, no observamos diferencias estadísticamente significativas, como se muestran en la tabla 17, para los procedimientos que duraron más de 150 minutos (dos horas y media de cirugía) con respecto a los procedimientos inferiores a dicha duración.

Tabla 17. Comparación de la FMD relativa (%) basal, a las 6, y 24 horas post-cirugía según el tiempo de duración de la intervención quirúrgica											
Medición de la FMD	FMD relativa (%)										p
	Duración ≥ 150 minutos (N=22)					Duración < 150 minutos (N=19)					
	Media	DE	Mediana	P-25	P-75	Media	DE	Mediana	P-25	P-75	
Basal (0 h)	17,11	7,24	16,44	11,11	20,51	12,81	9,15	11,43	7,32	18,75	0,123 *
Post-cirugía (6 h)	7,54	4,82	5,57	4,35	9,68	3,77	5,26	4,76	2,00	7,32	0,089 **
Post-cirugía (24 h)	15,90	9,27	12,66	10,81	17,14	11,01	6,35	11,36	8,11	14,71	0,102 **
FMD: “flow mediated dilatation” (vasodilatación mediada por flujo).											
N= número de observaciones; DE= desviación estándar; P-25: Percentil 25; P-75: Percentil 75.											
* t de Student para muestras independientes (contraste a dos colas) con distribución normal (test de Kolmogórov-Smirnov).											
** U de Mann-Whitney para muestras independientes. Distribución no normal (test de Kolmogórov-Smirnov).											

5.13 Relación entre los niveles séricos de IL-6 y la presencia o no de complicaciones en el posoperatorio inmediato.

Tabla 18. Comparación de la IL-6 basal, a las 6, y 24 horas post-cirugía entre pacientes que han tenido o no complicaciones quirúrgicas											
Medición de la IL-6	IL-6 (pg/ml)										p*
	Con complicaciones (N=10)					Sin complicaciones (N=22)					
	Media	DE	Mediana	P-25	P-75	Media	DE	Mediana	P-25	P-75	
Basal (0 h)	6,83	4,71	5,15	4,40	12,10	7,07	8,62	4,10	2,30	6,90	0,509
Post-cirugía (6 h)	47,19	30,45	37,70	32,40	51,90	28,28	22,47	24,90	11,80	33,00	0,009
Post-cirugía (24 h)	84,73	41,49	92,15	76,90	115,50	49,90	51,01	37,55	18,70	45,50	0,035
IL: Interleucina; N= número de observaciones; DE= desviación estándar; P-25: Percentil 25; P-75: Percentil 75.											
* U de Mann-Whitney para muestras independientes. Distribución no normal (test de Kolmogórov-Smirnov).											

Como claramente se puede observar, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (pacientes con o sin complicaciones posquirúrgicas) en los niveles séricos de IL-6 en el momento inicial, son grupos comparables y la diferencia entre sus medias es mínima. Justo lo contrario de lo que ocurrió en el periodo posoperatorio a las seis horas y a las veinticuatro horas donde la diferencia observada entre los niveles séricos de IL-6 entre ambos grupos es estadísticamente significativa en ambos periodos posquirúrgicos y con valores de IL-6 en el grupo de complicadas mucho mayores que en el grupo sin complicaciones asociadas.

6 DISCUSIÓN (Y SUGERENCIAS PARA FUTUROS TRABAJOS).

En las últimas dos décadas hemos asistido a un creciente interés por lo que en realidad era, en apariencia, una capa única de células que tapizaban los vasos del organismo: el endotelio. Dicho interés se ha visto especialmente avivado en el estudio de los pacientes sépticos^{4,5,138} y en el campo de las enfermedades cardiovasculares^{17-19,139}. Las múltiples funciones relacionadas con el control de la homeostasis que atesoran las células endoteliales incita a analizar el papel de este endotelio en todos aquellos procesos donde dicho equilibrio reviste una importancia capital. Y ese es el caso del paciente sometido a una intervención quirúrgica.

Múltiples son los estudios que, en este ámbito, han estudiado las reacciones y respuestas fisiológicas asociadas al acto quirúrgico en relación a reacciones hormonales y cambios metabólicos con estudio preferente por las modificaciones en las concentraciones sanguíneas de múltiples sustancias en la fase temprana del posoperatorio: cortisol, glucosa, proteínas de fase aguda, electrolitos, hormonas tiroideas, insulina, etc. y más recientemente por las citocinas, las cuales poseen un papel primordial en la respuesta inflamatoria al traumatismo ya sea éste quirúrgico o no. Tras la cirugía mayor,^{140,141} las principales citocinas producidas con efectos proinflamatorios son la IL-1, el TNF y la IL-6. La reacción inicial es la producción de IL-1 y TNF en los tejidos lesionados por parte de los macrófagos y monocitos activados. Ambas citocinas estimulan la secreción de IL-6, la principal citocina responsable de los cambios sistémicos aglutinados bajo la denominación de *respuesta de fase aguda*. Pero a pesar de una exhaustiva observación de las variaciones en las

concentraciones de sustancias en el posoperatorio inmediato no existen investigaciones que analicen, de forma no teórica, que es lo que ocurre realmente con el funcionamiento del endotelio en las fases tempranas de este periodo. Esto se debe a varios factores y, entre ellos, destaca la ausencia de métodos extendidos y directos de medición de la función endotelial de forma predominante. Publicado muy recientemente,¹⁴² existe un estudio sobre treinta pacientes sometidos a cirugía cardíaca que consigue medir mediante medida de perfusión en la microcirculación de la piel con láser Doppler una disfunción endotelial a los siete días tras la intervención. En este estudio no se obtienen datos de lo ocurrido en las horas posquirúrgicas inmediatas.

La vasodilatación mediada por flujo o FMD como método de medición de la función endotelial en un instante determinado sí reviste un interés creciente en estudios con pacientes y, a parte de su naturaleza no invasiva, parece respaldar su uso la menor variabilidad observada con respecto a otras técnicas encargadas de medir la función endotelial como el análisis de onda de pulso.¹⁴³ Su mayor campo de aplicación radica en el estudio de las enfermedades cardiovasculares y su relación con la función endotelial y en la significación de sus valores como factor pronóstico de éstas y de sus tratamientos.¹³¹⁻¹³⁵ Existe un estudio sobre pacientes intervenidos de cirugía vascular que con el uso de esta técnica en el momento preoperatorio estratifica, con valor pronóstico, la posibilidad de ocurrencia de eventos cardíacos en los treinta días siguientes a la intervención. En dicho estudio no existió más que una medida en el periodo basal con respecto a la FMD.¹⁴⁴ En otro estudio que estudiaba los efectos de la revascularización de miembros inferiores con injerto en 54 pacientes mediante

medida de FMD en preoperatorio y a las cuatro semanas se observó una mejora de la función endotelial tras la cirugía a la cuarta semana con aumento de la FMD estadísticamente significativa.¹⁴⁵

Así pues, prácticamente no existen estudios que investiguen la evolución de la función endotelial mediante esta interesante técnica en las horas siguientes a un estímulo que pudiera alterarla. En este aspecto resulta de gran atractivo un estudio publicado con sólo doce pacientes en una revista de gran prestigio¹⁰¹ sobre la asociación existente entre la inflamación asociada a una vacunación con *Salmonella typhi* en sujetos sanos y una disfunción endotelial medida mediante FMD, observada a las ocho horas tras la vacunación y que se recupera a las treinta y dos horas.

Nuestro interés principal, con este estudio, era averiguar si, a través de la medida de la función endotelial con la técnica de la vasodilatación mediada por flujo, encontrábamos variaciones de ésta que pudieran corresponder a una teórica afectación de dicha función por el estímulo inflamatorio activado por el proceso quirúrgico. Los resultados obtenidos y resumidos en la figura 11, indican que sí existe dicha disfunción endotelial a las seis horas del procedimiento y que la proporción del cambio es estadísticamente significativa. Y que, además, a las veinticuatro horas, asistimos a una recuperación casi completa de la función del endotelio, de manera que la afectación endotelial causada por la inflamación asociada a la cirugía es un fenómeno predominantemente transitorio en la gran mayoría de pacientes.

FMD relativa (%) basal y a las 6 y 24 horas posquirúrgicas.

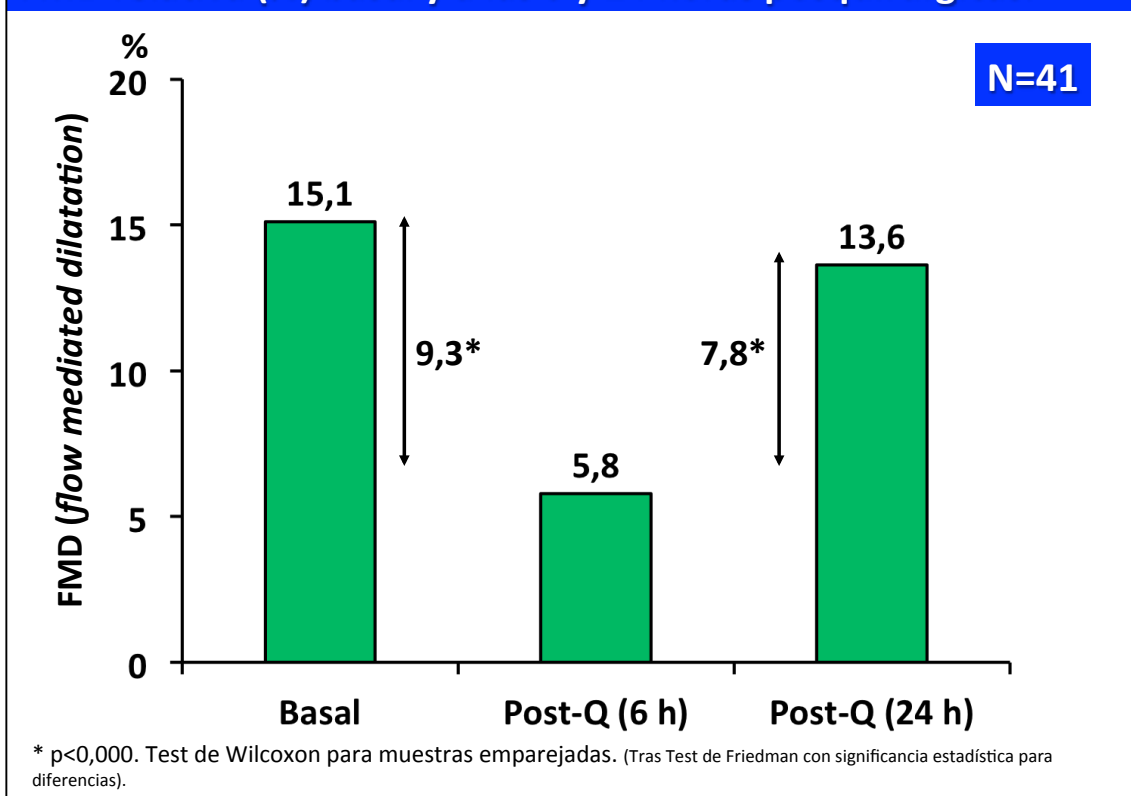


Figura 11: esquema de los hallazgos principales del estudio con respecto a la FMD en porcentaje de cambio en el periodo posquirúrgico inmediato.

Este análisis correspondía a la hipótesis principal de estudio de este trabajo y el hecho de usar pruebas no paramétricas, menos precisas que las paramétricas para la “resolución estadística” de la cuestión planteada no le resta robustez a la conclusión encontrada, más bien al contrario puesto que el uso de pruebas no paramétricas, con su menor precisión, implica realmente que sólo diferencias mayores podrán demostrarse como significativas. El hecho de encontrarlas con este análisis es una de las fortalezas de este estudio, pues.

Para evitar una heterogeneidad exagerada en el tipo de procedimiento, la población a estudiar fueron los sujetos sometidos a una intervención de tipo traumatológico y no se incluyeron otro tipo de cirugías durante un periodo determinado.

Cualquier estudio biológico debe asegurar, en la medida de sus posibilidades, la calidad de las mediciones realizadas en él. Esta cuestión es fundamental no sólo por el simple hecho de conceder un nivel de garantía suficiente a las conclusiones del estudio. La razón fundamental radica en los procesos futuros, las decisiones clínicas y las líneas de investigación que se apoyarán, indefectiblemente, en los aspectos más relevantes de dichas conclusiones. La calidad de una medida depende tanto de su validez como de su fiabilidad. Mientras que la validez expresa el grado en el que realmente se mide el fenómeno de interés, la fiabilidad indica hasta qué punto se obtienen los mismos valores al efectuar la medición en más de una ocasión, sometido a condiciones similares. Si nos concentramos en la validez de la FMD para detectar la disfunción endotelial, tenemos el apoyo de la abundante literatura científica de calidad^{125,126,130,146} que lo reconoce como un medio válido y el más recomendable para dicho análisis. Además, hay que considerar que no se está midiendo únicamente *actividad vasodilatadora del NO*. Con esta técnica medimos realmente parámetros que nos indican *verdadera y completa* pérdida de funciones endoteliales, puesto que la determinación local de la biodisponibilidad de NO no refleja solamente la influencia de esta molécula en el tono vascular, sino también la alteración posible en otras importantísimas funciones en las que esta molécula participa como la tromboregulación, la

adhesión y la proliferación celular.⁷⁹ Para evaluar la fiabilidad del eco-Doppler a la hora de medir los diámetros arteriales y, por tanto, obtener los resultados numéricos que nos permitan identificar la vasodilatación mediada por flujo como variación en porcentaje o valor absoluto debemos valorar la repetibilidad y la concordancia interobservador que nos permitirán concluir que nuestros resultados son fiables y que nuestra experiencia es exportable al campo de la investigación o de la clínica. Para el análisis de la concordancia entre mediciones, teniendo en cuenta que estamos ante una variable cuantitativa, se ha utilizado el coeficiente de correlación intraclase (CCI), el índice más apropiado para cuantificar la concordancia entre diferentes mediciones de una variable *numérica*. Se trata de una proporción y como todas ellas los valores del CCI pueden oscilar entre 0 y 1, de modo que la máxima concordancia posible corresponde a un valor de $CCI=1$. En este caso, toda la variabilidad observada se explicaría por las diferencias entre sujetos y no por las diferencias entre los métodos de medición o los diferentes observadores. Tras análisis con SPSS versión 19.0 de los valores dobles obtenidos por dos observadores independientes en 30 sujetos que cumplieran los criterios de inclusión y exclusión enunciados, obtuvimos un $CCI=0'897$. A la hora de interpretar los valores del CCI toda clasificación es lógicamente subjetiva, si bien resulta útil disponer de una clasificación como la que proponen autores como Fleiss¹⁴⁷, ampliamente extendida, y que clasificaría nuestro índice en el límite entre buena y muy buena concordancia.

Valor de CCI	Fuerza de la concordancia
>0,90	MUY BUENA
Entre 0,71-0,90	BUENA
Entre 0,51-0,70	MODERADA
Entre 0,31-0,50	MEDIOCRE
<0,30	MALA O NULA

Tabla 19: Valoración de la concordancia según los valores del Coeficiente de Correlación Intraclass (CCI)(según Fleiss).¹⁴⁷

Se intentó cuantificar el estímulo hiperémico reactivo pues, aunque no se hace mención en las guías generalmente a la necesidad de su análisis y no se describe en los estudios que sea un factor confusor en la metodología, hemos considerado que, al menos en un plano teórico, podría tener influencia en la variación del efecto resultante vasodilatador y llevar a resultados no comparables. La fuerza de cizalla tangencial que inicia el proceso fisiológico que nos lleva a la obtención de la FMD puede calcularse registrando la velocidad de pico sistólico mediante el eco-Doppler tras la liberación del manguito. Esto es lo que se hizo (subapartados 5.6 y 5.7 de este trabajo) y se compararon los resultados para ver que no existían diferencias significativas entre ellas salvo en el caso del flujo obtenido tras el desinflado del manguito entre el momento basal y el de las seis horas. En este caso resulta que sólo ligeramente, aunque significativo, el estímulo post-manguito a las 6 horas (media de 144,25 cm/s) fue superior al basal (130'94 cm/s). Pero esta diferencia en la que se presentaba un estímulo levemente mayor de fuerza tangencial no se tradujo en una mayor vasodilatación mediada por flujo en el

periodo que corresponde a las seis horas, como hubiera correspondido fisiológicamente, sino en una vasodilatación menor, dato que –junto a la ausencia de diferencias entre el resto de flujos iniciales y post-manguito comparados- nos lleva a concluir que las diferencias observadas en la vasodilatación mediada por flujo en los tres periodos estudiados no son explicables por estímulos hiperémicos diferentes o predisponentes a los hallazgos encontrados. Únicamente hemos encontrado la consideración de aportar dichos datos relativos a la calidad del estímulo hiperémico en las guías publicadas por Corretti¹⁴⁸ y colaboradores en 2002. Personalmente somos de la misma opinión que estos autores y consideramos que, en caso de medidas repetidas en los mismos pacientes, los datos relativos a la velocidad de pico del flujo deben ser aportadas en el estudio para un correcto análisis de los resultados obtenidos.

Con respecto a la metodología empleada en la realización de la técnica existen ciertos aspectos que deben ser cuidados extremadamente a fin de realizar una técnica suficientemente depurada de errores que nos permita extraer datos reales de nuestro cálculo de la FMD. Resulta fundamental evitar el problema relacionado con el tiempo de adquisición de las imágenes.¹⁴⁹ Por acuerdo, en la mayoría de los estudios que emplean la técnica de la FMD, se establece la obtención de las imágenes para su análisis tras un tiempo exacto tras el desinflado del manguito de presión que suele establecerse como de sesenta segundos. Tal y como demostraron Bressler y colaboradores menos de la mitad de los sujetos estudiados había alcanzado su valor máximo en este tiempo, siendo el tiempo medio hasta alcanzar dicho valor máximo de 81

segundos tras el desinflado, con un rango que va de 40 a 140 segundos.¹⁴⁹ Esto significa que nuestra técnica que estudia secuencias de diez segundos registrando hasta tres minutos después del desinflado del manguito permitiría encontrar realmente ese valor máximo y obtener fiablemente el valor exacto de FMD en cada paciente.

Otro potencial problema intrínseco a la técnica radica en la expresión típica de la FMD como porcentaje de cambio del diámetro tras el estímulo con respecto al diámetro basal de la arteria humeral, puesto que algunas diferencias de medida pueden exagerar o minimizar el resultado obtenido.¹⁴⁸ El hecho de expresar en este trabajo (subapartados 5.4 y 5.5) la FMD no sólo como *porcentaje de cambio* sino también como *valor absoluto de cambio* y encontrar diferencias estadísticamente significativas con resultados coincidentes, o sea una disfunción endotelial a las seis horas, independientemente de la forma de expresión de la FMD, minimiza y -en nuestra opinión- llega a anular la realidad de este problema.

Existe amplia evidencia en la literatura científica de que el TNF- α y la IL-1 son las principales citocinas proinflamatorias que inician la respuesta asociada al proceso inflamatorio tras una agresión. Pero esta misma literatura describe como estas moléculas son tan rápidamente liberadas como aclaradas del corriente circulatorio tras el estímulo nocivo. A título de ejemplo, en un aclarativo estudio de Lin y Lowry¹⁵⁰ sobre la secuencia de expresión de citocinas inflamatorias tras administración de lipopolisacáridos bacterianos, se observa como el TNF- α presenta un pico máximo de concentración plasmática

a la hora del insulto, con valores prácticamente indetectables en sangre de la citocina a partir de las tres horas tras el evento desencadenante. En este mismo experimento la IL-6 presenta un pico máximo de concentración sérica a las tres horas con capacidad de detección de la citocina más allá de las seis horas tras el estímulo nocivo. Cabe recordar aquí que la IL-6⁴⁷, que es estimulada por el TNF y la IL-1, inhibe, a su vez, la producción de ambas citocinas. En nuestro trabajo se encontró un descenso estadísticamente significativo a las seis horas de la cirugía con respecto a los valores en basal y a las veinticuatro horas de la IL-1, pero dadas las cantidades ínfimas detectadas muy inferiores a los valores límites de la normalidad y, por tanto, alejadas de significancia clínica, junto a la circunstancia de que existan únicamente diferencias estadísticamente significativas en los valores de TNF entre las 6 y las 24 horas posquirúrgicas a pesar de que ninguna media alcance valores patológicos, nos hace más bien pensar que se trata de resultados prácticamente anecdóticos en razón de los valores séricos ínfimos en todos los casos y entendemos que el hecho de que no encontremos concentraciones elevadas postoperatorias de ambas citocinas no descarta su papel, su actividad biológica ni su presencia en este fenómeno. Conociendo, además, la eventualidad de que ambas moléculas presentan una vida media corta que es menor de 20 minutos para el TNF y de 10 minutos para la IL-1,^{62,151} nos parece más acertado concluir que el protocolo diseñado en el estudio impedía la adecuada detección de los niveles de ambas citocinas y que dadas las características biológicas de ambas moléculas con vidas medias muy cortas, el desconocimiento aún de su fisiopatología exacta y contando con el hecho fundamental de la retroalimentación negativa producida por la IL-6, las

posibilidades de detección de ambas citocinas en el área clínica va a resultar infrecuente y poco efectivo. Así se deduce de un estudio realizado con catorce pacientes sometidos a resección e injerto por aneurisma de aorta abdominal donde se intentaba caracterizar el impacto de la cirugía en la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias. Los resultados de este estudio¹⁵² mostraron respuestas deprimidas para las concentraciones de IL-1 y TNF en periodos intraoperatorios (desclampaje y 90 minutos tras desclampaje) y postoperatorios inmediatos (24 horas tras la cirugía) y concentraciones de IL-6, por el contrario, crecientes en las primeras veinticuatro horas. Todos estos datos son coincidentes con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Existen además otros factores que contribuyen a la complejidad para cuantificar las citocinas, como los efectos locales de éstas en los tejidos lesionados. Especialmente en el caso de las potentes citocinas “primigenias” TNF e IL-1, que son capaces, con concentraciones *locales* mínimas, de desatar una reacción en cadena muy amplificada y de repercusión global, a pesar de su práctica ausencia en el torrente circulatorio. Esto limita la posible aplicación clínica de su detección pero también implica un valor limitado de sus valores séricos para la comprensión de la biología de la citocinas. Existen técnicas de medida alternativas para atenuar esta dificultad como la medición de las citocinas asociadas a células mediante la citometría de flujo o el estudio de la secreción de citocinas en células mononucleares aisladas de la circulación.^{153,154} Son herramientas de análisis complementarias pero su coste, su complejidad, la necesidad de técnicas estandarizadas y la gran dotación de

equipamiento indispensable imposibilitan su uso en la clínica habitual, relegándolas al estricto campo de la investigación avanzada.

Los valores de IL-6 plasmáticos parecen estar asociados con la magnitud del insulto quirúrgico. En algunos estudios se ha demostrado que los valores de IL-6 y PCR están claramente asociados a la magnitud de la lesión causada y a la invasividad y agresividad de la técnica quirúrgica, al contrario que valores como la concentración de cortisol (hormona del estrés) o el recuento leucocitario que no mostraron correlación. Así pues, existieron grandes diferencias entre estos valores de PCR e IL-6 entre reparaciones abiertas de aneurismas aórticos y cirugías abdominales laparoscópicas.³³

A diferencia de la IL-1 y el TNF, la facilidad para detectar concentraciones específicas y valorables de IL-6 en sangre tras una acción lesiva al organismo que desencadena un proceso de respuesta inflamatoria, incita a estimar a esta citocina como un buen indicador de la inflamación sistémica en el organismo. Además, los niveles de expresión de la IL-6 han sido asociados con la magnitud de la pérdida sanguínea intraoperatoria,¹⁵⁵ el grado de quemadura^{156,157} y la extensión de tejido lesionado durante la cirugía.^{33,61} En nuestro estudio, al estudiar la relación existente entre los niveles de IL-6 y la aparición o no de complicaciones en el posoperatorio inmediato obtenemos, tal y como se muestra en el subapartado 5.13, que, a pesar de tener niveles basales de IL-6 similares entre ambos grupos, asistimos a unos niveles mucho mayores en el grupo con complicaciones posteriores a la cirugía con respecto al grupo sin ellas, con diferencias que resultan estadísticamente significativas

tanto a las 6 como a las 24 horas del proceso quirúrgico. De esta manera, la conjetura que nos planteamos de que realmente los mayores niveles de IL-6 están asociados a una tasa mayor de complicaciones es, a la luz de los hallazgos, realmente cierta.

Con respecto a la relación de las citocinas con la disfunción endotelial y considerando todo lo expuesto hasta ahora, no existieron datos que correlacionaran las diferentes interleucinas proinflamatorias estudiadas con la disfunción endotelial. Hay que remarcar además que, recordando aquí los niveles de citocinas séricas normales que corresponde a valores de 0 a 87 pg/ml para TNF α , de 0 a 15 pg/ml para IL-1 y de 0 a 10 pg/ml para IL-6, todas las diferencias observadas en concentraciones séricas de TNF e IL-1 pueden definirse como sin significancia clínica y prácticamente anecdóticas. Y únicamente el aumento de interleucina 6 a las seis y a las veinticuatro horas de la cirugía estaría en rangos no normales y especialmente aumentados sin que exista asociación con el comportamiento de la funcionalidad endotelial.

Es posible que el estado del endotelio pueda reflejar el grado en el cual la vasculatura se altera por estímulos inflamatorios sistémicos y, con esto, proveer, a las técnicas encargadas de su análisis, de un potencial papel en la obtención de información adicional sobre el pronóstico de los pacientes. Los estudios disponibles hasta el momento que asocian la disfunción endotelial a eventos cardiovasculares futuros permiten suponer que la técnica de la FMD puede tener utilidad clara en el manejo individual de los pacientes. En los pacientes con hipertensión arterial y enfermedad coronaria el análisis de la

disfunción endotelial permite identificar individuos que pueden beneficiarse de una terapia más intensiva.^{158,159} Los pacientes con hipertensión arterial esencial con tratamiento antihipertensivo pero con disfunción endotelial clara guardan peor pronóstico a la larga y la FMD puede usarse para monitorizar la eficacia del tratamiento en la reducción del riesgo cardiovascular.¹⁶⁰ Igualmente, estudios prospectivos de pacientes con enfermedad arterial periférica sugieren que aquellos con función endotelial conservada tienen un riesgo menor para eventos futuros.^{132,144} En nuestro estudio la relación de la vasodilatación mediada por flujo con factores como el tabaquismo, la presencia de hipertensión arterial o la presencia de foco de fractura previo no arrojaron diferencias estadísticamente significativas en los tres periodos de estudio. Únicamente existió una diferencia significativa al relacionar las características basales con la FMD y es un mayor valor de FMD y, por tanto, una mejor funcionalidad endotelial en el grupo de pacientes con hipercolesterolemia (7 pacientes) con respecto al grupo sin hipercolesterolemia detectada (34 pacientes), diluyéndose el efecto en los periodos posquirúrgicos. Este hallazgo, aparentemente contradictorio, de mejor FMD en los pacientes hipercolesterolémicos puede hallar su explicación en el hecho de que todos ellos estaban correctamente tratados con estatinas previamente a la intervención quirúrgica y éstas, recetadas para tratamiento hipercolesterolémico aislado sin relación con patología vascular asociada, eran tomadas a bajas dosis. Las estatinas pueden ejercer efectos independientes de la reducción de colesterol, entre ellos una mejora de la función endotelial con beneficio cardioprotector. Más recientemente se ha mostrado que las estatinas a bajas concentraciones guardan un efecto proangiogénico mientras que a

altas dosis tendrían un efecto contrario y antiangiogénico.¹⁶² Este efecto de las estatinas se denomina *efecto bifásico*. Las bajas concentraciones de las estatinas induciría los efectos proangiogénicos a través de la activación de la cinasa/Akt PI3 produciendo una fosforilación de la eNOS¹⁶³ y un aumento de producción de óxido nítrico que podría estar en relación con el hallazgo encontrado en nuestro estudio.

En un estudio prospectivo sobre 172 pacientes hipertensos sin complicaciones previas y con exclusión de disfunción ventricular sistólica previa mediante estudio ecocardiográfico se observó, tras un seguimiento medio de 95 meses, que la FMD inicial inferior a un 4.7% duplicaba la tasa de sufrir eventos cardiovasculares fatales o no.¹⁶¹ Las arterias sanas muestran un incremento típico de su diámetro del 5 al 15%.^{148,158} Ese sería el valor que aceptaríamos como “normal” o no patológico, pues de la FMD. En pacientes con biodisponibilidad de NO alterada la respuesta vasodilatadora está muy disminuida o, incluso, en algunos pacientes puede observarse una respuesta constrictiva, obteniendo valores negativos de FMD¹⁴⁹. En nuestro estudio un único paciente presentó FMD negativo previo a la intervención. En nuestro estudio únicamente tres pacientes presentaron valores de FMD inferiores a 5% basales frente a 38 pacientes con FMD basal normal y dado el ínfimo número de individuos en el grupo con FMD patológico basal se consideró que un análisis estadístico carecía de interés y fiabilidad en los resultados que hubiéramos podido obtener. Aun así nos parece destacable el hecho de que el único paciente con FMD negativo en condiciones basales y, por tanto, con menor reserva endotelial a la hora de enfrentarse a la cirugía y que, además,

fue el único paciente que mantuvo respuesta vasoconstrictora –es decir, FMD negativas- en los tres periodos estudiados, falleció en el séptimo día posoperatorio por cuadro de íleo adinámico, infección de herida quirúrgica y neumonía. Dado que el estudio únicamente analizó el periodo correspondiente al posoperatorio inmediato, no resulta posible asociar si una mayor disfunción endotelial obtenida en ese periodo se asocia a una mayor predisposición para complicaciones tardías o eventos cardiovasculares. Esta hipótesis podría ser objeto de estudios posteriores con un número mayor de sujetos. Sí se observó, en cambio, en este estudio, que la aparición de complicaciones en las primeras veinticuatro horas no implicaba un mayor deterioro de la FMD en porcentaje de cambio a excepción del subgrupo con anemización con necesidad de transfusión. En esos cuatro pacientes la FMD % basal media fue de 24,38% con una descenso muy marcado en los cuatro pacientes a un valor medio de 5,83% a las seis horas y coincidiendo con el estado anémico y posterior ascenso de la FMD % a las 24 horas con media de 29,17%. Esta observación se incluye aquí para remarcar el interés de futuros trabajos en la valoración de la existencia de una mayor disfunción endotelial ante episodios de anemización aguda.

Con respecto al resto de las variables asociadas al proceso, o sea, tipo de anestesia y duración de la intervención, no se observaron diferencias que impliquen que la anestesia regional causa menor o mayor vasodilatación mediada por flujo que la anestesia general en el posoperatorio inmediato. Y del mismo modo no se observó influencia en la FMD de la duración de la intervención.

Por su naturaleza no invasiva, la técnica de la medición de la vasodilatación mediada por flujo, permite su aplicación en la mayor parte de las personas y realizar repeticiones de las mediciones para efectuar un seguimiento temporal de los cambios aparecidos y una monitorización longitudinal de los pacientes.

A fin de permitir una mayor reproducibilidad de las determinaciones resultaría fundamental el seguimiento de ciertos protocolos estandarizados de cómo se debe realizar la técnica que permitan una comparación fiable entre resultados de diversos estudios pero del mismo modo resulta muy deseable establecer un alto nivel de automatización de la obtención y de la manipulación de los datos y/o imágenes que por razones de índole económicas y de dotación hospitalaria no fueron posibles en el desarrollo de este trabajo. Sería provechoso, pues, conseguir un software que permita la medición automática de la vasodilatación. Esto facilitaría, además, la gestión de los procesos necesarios para su obtención, reduciría el tiempo por examen y simplificaría el procedimiento, permitiendo, así, la realización de estudios con inclusión de mayor número de pacientes.

Hasta cierto punto podríamos admitir como limitación de este estudio la circunstancia de que el análisis de la FMD se base en una herramienta diagnóstica *operador-dependiente*, como es la ecografía eco-Doppler. Aunque admisible, cabe recordar aquí que la ecografía eco-Doppler está ampliamente arraigada, a pesar de esta característica intrínseca, en múltiples campos de la clínica donde constituye una herramienta no solamente fiable sino esencial. Además, el hecho de contar con un protocolo metodológico estricto basado en

guías internacionalmente aceptadas y fundamentadas en conceptos fisiológicos y de haber realizado un análisis previo de la concordancia interobservador, a nivel local, mediante el cálculo del coeficiente de correlación intraclase, permite controlar las influencias que esta característica pudiera tener sobre los datos. Sí debemos reconocer que, como ya hemos sugerido anteriormente, una automatización de la técnica podría suprimir aún más el peso de esta dependencia del operador en la ecografía y en el cálculo asociado.

Es de entender que en caso de complicaciones posquirúrgicas no resueltas tal disfunción endotelial no sería transitoria. No es una conclusión que se pueda extraer de los resultados de este estudio donde no existieron complicaciones graves mantenidas en la fase final, veinticuatro horas posoperatorias, del periodo de estudio. Pero es una condición a estudiar en futuros proyectos de investigación y en series con cirugías de mayor agresividad donde no sólo puede verse ampliado el periodo de “recuperación” de la función endotelial hacia su estado basal previo, sino que también podemos encontrar la no recuperación en caso de complicación grave tipo sangrado, fallo multiorgánico o sepsis mantenida en el tiempo.

A modo de sugerencia para un futuro trabajo, proponemos correlacionar datos analíticos de hipotética mayor agresividad quirúrgica como los valores elevados de IL-6^{33,61} con medición de deterioro del sistema inmune (expresión de antígenos HLA-DR en monocitos).^{164,165} La expresión de la molécula de clase II del sistema mayor de histocompatibilidad HLA-DR se considera un útil

marcador de la activación inmunitaria, crucial para la presentación y el reconocimiento de antígenos. Existen varios estudios que analizan los efectos de la anestesia y la cirugía sobre la presentación de antígenos analizando el número de moléculas HLA-DR mediante citometría de flujo. Se observa un descenso de los valores dos horas después de cesar la circulación extracorpórea y tras la cirugía cardíaca¹⁶⁶ y abdominal mayor,¹⁶⁷ del mismo modo que a los diez minutos de la inducción anestésica con fentanilo a altas dosis en pacientes sometidos a cirugía cardíaca.¹⁶⁸ Además, conocemos que la expresión de estas moléculas aparece reducida tras la hemorragia o la hipotensión grave en estudios sobre ratones con persistencia durante varios días a pesar de la reposición con volumen.¹⁶⁹ Un posible estudio que correlacionará la IL-6 como “marcador” de agresividad quirúrgica con la HLA-DR como “marcador” de activación inmunitaria nos permitiría, en cierto grado, valorar si a mayor agresividad pudiera existir mayor grado de inmunosupresión.

Como otras posibles limitaciones del estudio, nombraremos que el pequeño número de pacientes puede ser una razón para que algunos resultados no alcancen significancia estadística. Aun así, nuestros hallazgos son homogéneos y uniformes. Se trata de un estudio observacional de un fenómeno que se supone en la práctica totalidad de los pacientes sometidos a una intervención por lo que, en principio, se precisa de una muestra pequeña y no necesariamente aleatorizada para demostrar o no su presencia.

Consideramos, que en posibles estudios futuros del tema, sería planteable añadir, al análisis, una determinación, además, de citocinas antiinflamatorias

para delimitar mejor el fenómeno del posoperatorio inmediato. En este caso no existía la posibilidad de determinación en el hospital ni siquiera a través de laboratorio externo y no existieron fuentes de financiación a la investigación que soportaran su inclusión.

7 CONCLUSIONES.

Como conclusiones principales de este trabajo destacaremos que:

- La agresión asociada al acto quirúrgico provoca una disfunción endotelial transitoria en el humano en las horas siguientes a la cirugía que podemos medir mediante la técnica de la vasodilatación mediada por flujo.
- Existe un aumento progresivo de los niveles séricos de interleucina 6 en las primeras veinticuatro horas del posoperatorio en los pacientes sometidos a una intervención quirúrgica.
- La presencia de complicaciones en el posoperatorio inmediato se asocia, de forma estadísticamente significativa, a una mayor concentración sérica de interleucina 6 a las seis y a las veinticuatro horas de la cirugía.

8 CONCLUSIONS.

Les principales conclusions de cette étude soulignent que:

- L'agression associée à la procédure chirurgicale entraîne une dysfonction endothéliale transitoire chez l'humain dans les heures qui suivent une intervention chirurgicale qui peut être mesurée par la technique de la vasodilatation médiée par le flux.
- Il y a une augmentation progressive des niveaux sériques d'interleukine-6 dans les premières vingt-quatre heures après l'opération chez les patients subissant une chirurgie.
- La présence de complications dans la période post-opératoire immédiate est associée, de façon statistiquement significative, à des niveaux sériques plus élevés d'interleukine-6 dans les six et vingt-quatre heures suivant la chirurgie.

9 SUGGESTIONS POUR LES TRAVAUX FUTURS.

Étant donné sa nature non invasive, la technique de la mesure de la vasodilatation médiée par le flux, permet son application dans la plupart des individus et la possibilité de faire des mesures répétées pour déterminer des modifications temporaires possibles et un suivi longitudinal des patients .

Pour permettre une plus grande reproductibilité des mesures, il serait essentiel de réaliser la technique selon certains protocoles normalisés pour permettre une comparaison fiable entre les résultats des différentes études, mais aussi il est très souhaitable de fournir un niveau élevé d'automatisation dans l'acquisition et la manipulation de données et / ou des images. Pour des raisons de nature économique et de dotation en personnel hospitalière cette question n'a pas été possible dans le développement de ce travail. Il serait utile, alors, d'obtenir un logiciel permettant la mesure automatique de la vasodilatation. Ceci permettrait aussi dans la gestion des processus nécessaires, réduire le temps d'examen et de simplifier le processus, permettant ainsi des études avec plus de patients.

Dans une certaine mesure on pouvait admettre comme limitation de cette étude le fait que l'analyse de la vasodilatation médiée par le flux a été basé sur un outil de diagnostic qui est, par définition, opérateur-dépendant, tout comme l'échographie Doppler. Bien que recevable, il convient de rappeler ici que l'échographie Doppler est largement ancrée, en dépit de cette caractéristique intrinsèque, dans de multiples domaines de la clinique où non seulement est un

outil fiable, mais essentiel. En outre, le fait d'avoir suivi un protocole méthodologique basée sur les lignes directrices internationalement acceptées et basées dans les concepts physiologiques et aussi le fait d'avoir effectué une analyse préliminaire de la concordance inter-observateur en calculant le coefficient de corrélation intra-classe, permettent contrôler les influences que cette condition pourrait avoir sur les données. Il faut reconnaître que, comme suggéré ci-dessus, une automatisation de la technique pourrait encore plus supprimer le poids de la dépendance de l'opérateur à l'échographie et au calcul associé.

Il est entendu que si les complications postopératoires ne sont résolues, la dysfonction endothéliale ne serait pas transitoire. Ce n'est pas une conclusion qui peut être tirée à partir des résultats de cette étude où il n'y avait pas de complications graves dans les heures finales d'analyse, mais il est une condition à étudier dans des projets de recherche à l'avenir et surtout si on étudie des séries cliniques avec chirurgies d'agressivité accrue qui peuvent, non seulement *étendre* la période de «récupération» de la fonction endothéliale, mais aussi l'empêcher s'il existe des complications hémorragiques graves, une défaillance multiviscérale ou une septicémie maintenues au fil du temps.

Comme une suggestion pour les travaux futurs, nous proposons de mettre en relation des données analytiques hypothétiques de grande agressivité chirurgicale (niveaux élevés de IL-6)^{33,61} avec des données analytiques propres de déficience du système immunitaire (par exemple l'expression de HLA-DR

sur les monocytes)^{164,165} L'expression de la molécule de la classe II du complexe majeur d'histocompatibilité HLA-DR est considérée comme un marqueur utile de l'activation immunitaire, crucial pour la présentation et la reconnaissance des antigènes. Plusieurs études ont montré les effets de l'anesthésie et de la chirurgie sur la présentation de l'antigène en analysant le nombre de HLA-DR par cytométrie de flux. On observe une diminution dans ces valeurs deux heures après l'arrêt de la circulation extracorporelle et après une chirurgie cardiaque,¹⁶⁶ mais aussi après la chirurgie abdominale,¹⁶⁷ de la même façon que seulement dix minutes après l'induction de l'anesthésie avec du fentanyl à fortes doses chez les patients subissant une chirurgie cardiaque.¹⁶⁸ En outre, nous savons que l'expression de ces molécules apparaisse réduite après la saignée ou l'hypotension sévère dans les études sur des souris.¹⁶⁹ Une possible étude en établissant des liens entre IL-6 comme un "marqueur" d'agressivité chirurgicale et HLA-DR comme «marqueur» d'activation immunitaire nous permettra, dans une certaine mesure, de déterminer si un stimulus chirurgical plus agressif est associé à un majeur degré d'immunosuppression.

Comme d'autres limitations possibles de cette étude, nous allons nommer le petit nombre de patients qui est peut être une des raisons pour lesquelles certains résultats ne rencontrent pas de signification statistique. Pourtant, nos résultats sont cohérents et uniformes. Ceci est une étude observationnelle d'un phénomène que l'on suppose dans pratiquement tous les patients subissant une intervention de sorte que, en principe, elle nécessite un petit échantillon non aléatoire pour prouver ou non sa présence.

Nous croyons dans l'intérêt que dans les études futures soit souhaitable d'ajouter une analyse d'une nouvelle détermination de cytokines anti-inflammatoires afin de mieux définir le phénomène dans la période postopératoire immédiate. Dans notre cas, il n'y avait pas de possibilité de détermination dans l'hôpital et on n'avait pas de sources de financement externes pour la recherche a fin de soutenir son inclusion.

10 BIBLIOGRAFÍA.

1. Pera, C. El cuerpo herido: un diccionario filosófico de la cirugía. 1ª Ed. Madrid: El Acantilado; 2003.
2. Billroth, T. Die allgemeine chirurgische Pathologie und Therapie in funfzig Vorlesungen. 10ª Ed. Berlín: Druck und Verlag von G. Reimer; 1882.
3. Leclerc J, Pu Q, Corseaux D, Haddad E, Decoene C, Bordet R, et al. A single endotoxin injection in the rabbit causes prolonged blood vessel dysfunction and a procoagulant state. Crit Care Med 2000; 28(11):3672-8.
4. Mutunga M, Fulton B, Bullock R, Batchelor A, Gascoigne A, Gillespie JI, et al. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163(1): 195—200.
5. Reidy MA, Schwartz SM. Endothelial injury and regeneration. IV. Endotoxin: a nondenuding injury to aortic endothelium. Lab Invest 1983;48(1): 25-34.
6. Polunovsky VA, Wendt CH, Ingbar DH, Peterson MS, Bitterman PB. Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis. Exp Cell Res 1994; 214(2):584—94.
7. Messmer UK, Briner VA, Pfeilschifter J. Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells. Kidney Int 1999; 55(6):2322—37.

8. Stefanec T. Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* 2000; 117(3):841-54.
9. Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 1997; 89(7):2429-42.
10. Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 1999; 341(8):586-92.
11. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007; 21(3):157-71.
12. Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation* 1997; 96(9):3042-7.
13. Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1986; 163:740-5.
14. Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 1993; 73(1):205-9.
15. Yan G, You B, Chen SP, Liao JK, Sun J. Tumor necrosis factor- α downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA stability via translation elongation factor 1- α 1. *Circ Res* 2008; 103(6):591-7.
16. Jani M, Chinoy H, Warren RB, Griffiths CE, Plant D, Morgan AW, Wilson AG, Hyrich KL, Isaacs J, Barton A. Clinical utility of random anti-tumour necrosis factor drug testing and measurement of anti-drug antibodies on long-term treatment response in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2015; 385 Suppl 1:S48.

17. Chan SY, Mancini GB, Kuramoto L, Schulzer M, Frohlich J, Ignaszewski A. The prognostic importance of endothelial dysfunction and carotid atheroma burden in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:1037– 43.
18. Fathi R, Haluska B, Isbel N, Short L, Marwick TH. The relative importance of vascular structure and function in predicting cardiovascular events. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:616-23.
19. Zhang X, Zhao SP, Li XP, Gao M, Zhou QC. Endothelium dependent and independent functions are impaired in patients with coronary hearth disease. *Atherosclerosis* 2000; 149:19-24.
20. Lefer AM, Scalia R, LEfer DJ. Vascular effects of HMG CoA-reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2001; 49:281-7.
21. Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, et al. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1995; 332:481-7.

22. Mancini J, Gregory C, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1996; 94:258-65.
23. Huang A, Pinto JT, Froogh G, Kandhi S, Qin J, Wolin MS, et al. Role of homocysteinylation of ACE in endothelial dysfunction of arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; 308:92-100.
24. Tousoulis D, Simopoulou C, Papageorgiou N, Oikonomou E, Hatzis G, Siasos G, et al. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. *Pharmacol Ther* 2014; 144(3):253-67.
25. Anderson EA, Mark AL. Flow-mediated and reflex changes in large peripheral artery tone in humans. *Circulation* 1989; 79:93-100.
26. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:631-8.
27. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000; 101:948-54.
28. Schroeder S, Enderle MD, Ossen R, Meisner C, Baumbach A, Pfohl M, et al. Noninvasive determination of endothelium-mediated vasodilatation as a screening test for coronary artery disease: pilot study to assess the predictive value in comparison with angina pectoris, exercise electrocardiography, and myocardial perfusion imaging. *Am Heart J* 1999; 138:731-9.

29. Playford DA, Watts GF. Special article: non-invasive measurement of endothelial function. Clin Exp Pharmacol Physiol 1998; 25:640-3.
30. Takase B, Uehata A, Akima T, Nagai T, Nishioka T, Hamabe A. Endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in coronary and brachial arteries in suspected coronary artery disease. Am J Cardiol 1998; 82:1535-9.
31. Cuthbertson DP. Observations on the disturbance of metabolism produced by injury to the limbs. Q J Med 1932; 1:233-46.
32. Jaime Arias, María Ángeles Aller, José Ignacio Arias, Laureano Lorente. Generalidades Médico-Quirúrgicas. 1ª Ed. Madrid: Ediciones Tébar; 2002.
33. Watt DG, Horgan PG, McMillan DC. Routine clinical markers of the magnitude of the systemic inflammatory response after elective operation: a systematic review. Surgery 2015; 157(2):362-80.
34. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Basic immunology Functions and Disorders of the Immune System. 4ª Ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2009.
35. Ahmed NA, Christou NV, Meakins JL. The systemic inflammatory response syndrome and critically ill surgical patient. Curr Opin Crit Care 1995;1: 209-12.
36. Guyton AC, Hall JE, Tratado de Fisiología Médica. 12º edición Elsevier-Saunders, 2011.
37. Douglas RG, Shaw JH. Metabolic response to sepsis and trauma. Br J Surg 1989;76: 115-22.

38. Cutbertson DP. The disturbance of metabolism produced by bone and no-bony injury, with notes on certain abnormal conditions of bone. *Biochem J* 1930; 24:1244-63.
39. Desborough JP. The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth* 2000; 85:109-17.
40. Decker D, Schönford M, Bidlingmaier F, Hirner A, von Ruecker AA. Surgical stress induces a shift in the type-1/type-2 T-helper cell balance, suggesting down-regulation of cell-mediated and up-regulation of antibody-mediated immunity commensurate to the trauma. *Surgery* 1996;3: 316-25.
41. Forget P, Collet V, Lavand'homme P, De Kock M. Does analgesia and condition influence immunity after surgery? Effects of fentanyl, ketamine and clonidine on natural killer activity at different ages. *Eur J Anaesthesiol* 2010; 27:233-40.
42. Flohé S, Lendemans S, Schade FU, Kreuzfelder E, Waydhas C. Influence of surgical intervention in the immune response of severely injured patients. *Intensive Care Med* 2004; 30:96-102.
43. Lacroix S, Rivest S. Effect of acute systemic inflammatory response and cytokines on the transcription of the genes encoding cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) in the rat brain. *J Neurochem* 1998; 70:452-66.
44. Morrison EW, Wang P, Ba ZF, Ayala A, Chaudry IH. The complex pattern of cytokines in sepsis – association between prostaglandins, cachectin and interleukins. *Ann Surg* 1992; 214:141-8.

45. Klir JJ, McClellan JL, Kluger MJ. Interleukin-1 beta causes the increase in anterior hypothalamic interleukin-6 during LPS-induced fever in rats. *Am J Physiol* 1994; 266:E246-51.
46. De Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomao R. Citocinas y dolor. *Rev Bras Anesthesiol* 2011; 61:137-42.
47. Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects and inducers. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:742-80.
48. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation and pain. *Int Anesthesiol Clin* 2007; 45:27-37.
49. Raeburn CD, Sheppard F, Barsness KA, Arya J, Harken AH. Cytokines for surgeons. *Am J Surg* 2002; 183:268-73.
50. Hennein H. A., Ebba H., Rodríguez J. L., et al. Relationship of proinflammatory cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularization. *J Thorac. Cardiovasc Surg.* 1994; 108:626-635.
51. Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin Exp Immunol* 2007; 149:217-25.
52. Waterer GW, Quasney MW, Cantor RM, Wunderink RG. Septic shock and respiratory failure in community-acquired pneumonia have different TNF polymorphism associations. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1599-604.

53. Bernard GR, Luce JM, Sprung CL, Rinaldo JE, Tate RM, Sibbald WJ. High-dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1987; 317:1565-70.
54. Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 1987; 317:653-8.
55. Annane D, Sébille V, Charpentier C, Bollaert PE, François B, Korach JM. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 2002; 288:862-71.
56. Kilger E, Weis F, , Briegel J, Frey L, Goetz AE, Reuter D. Stress doses of hydrocortisone reduce severe systemic inflammatory response syndrome and improve early outcome in a risk group of patients after cardiac surgery. *Crit Care Med* 2003; 31:1068-74.
57. Lichtiger S, Binion DG, Wolf DC, Present DH, Bensimon AG, Wu E. The CHOICE trial: adalimumab demonstrates safety, fistula healing, improved quality of life and increased work productivity in patients with Crohn's disease who failed prior infliximab therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32:1228-39.
58. Cohen SB1, Moreland LW, Cush JJ, Greenwald MW, Block S, Shergy WJ. A multicentre, double blind, randomised, placebo controlled trial of anakinra (Kineret), a recombinant interleukin 1 receptor antagonist, in patients with rheumatoid arthritis treated with background methotrexate. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1062-8.

59. Taylor F B Jr., Chang A C K, Peer G, Ezban M, Hedner U. Active site inhibited factor VIIa (DEGR VIIa) attenuates the coagulant and interleukin-6 and -8, but not tumor necrosis factor, responses of the baboon to LD100 *Escherichia coli*. Blood. 1998; 91:1609–1615.
60. Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, Strecker W, Kinz L, Brückner UB. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? Arch Surg 2000; 135:291-5.
61. Kato M, Suzuki H, Murakami M, Akama M, Matsukawa S, Hashimoto Y. Elevated plasma levels of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte colony-stimulating factor during and after major abdominal surgery. J Clin Anesth 1997; 9:293-8.
62. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. Surgery 2000; 127:117-26.
63. Tanaka T, Kishimoto T. Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases. Int J Biol Sci 2012; 8:1227-36.
64. Trune DR, Kempton B, Hausman FA, Larrain BE, MacArthur CJ. Correlative mRNA and protein expression of middle and inner ear inflammatory cytokines during mouse acute otitis media. Hearing Research 2015; 326:49-58.
65. Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. Bioessays 1994; 16(12):901—6.
66. Miquel Dolç i Dolç (coordinador). Gran enciclopèdia de Mallorca. 1ª Ed. Palma: Promomallorca, 1989-91.

67. Arias J, Aller MA, Arias JI, Lorente L. Fisiopatología quirúrgica: traumatismos, infecciones, tumores. 1ª Ed. Madrid: Editorial Tébar S.L., 1999.
68. Ross MH, Pawlina W. Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. 5ª Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2008.
69. Luft JH. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc* 1966; 25(6):1773—83.
70. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* 2007; 454(3):345—59.
71. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(9):1541-7.
72. Koedam JA, Cramer EM, Briend E, Furie B, Furie BC, Wagner DD. P-selectin, a granule membrane protein of platelets and endothelial cells, follows the regulated secretory pathway in AtT-20 cells. *J Cell Biol* 1992; 116(3):617-25.
73. Malek AM, Izumo S. Control of endothelial cell gene expression by flow. *J Biomech* 1995; 28(12):1515—28.
74. Allaire E, Clowes AW. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the intimal hyperplastic response. *Ann Thorac Surg* 1997; 63(2):582—91.
75. Korshunov VA, Schwartz SM, Berk BC. Vascular remodeling: hemodynamic and biochemical mechanisms underlying Glagov's phenomenon. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(8):1722—8.

76. Loscalzo J, Vita JA. Ischemia, hyperemia, exercise, and nitric oxide. Complex physiology and complex molecular adaptations. *Circulation* 1994; 90(5):2556—9.
77. Mitchell GF, Parise H, Vita JA, Larson MG, Warner E, Keaney JF, et al. Local shear stress and brachial artery flow-mediates dilation: the Framingham Heart Study. *Hypertension* 2004; 44:134-9.
78. O'Rourke MF, Nichols WW. Shear Stress and Flow-mediated dilation. *Hypertension* 2004; 44:119-20.
79. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007; 115:1285-95.
80. Leclerc J, Pu Q, Corseaux D, Haddad E, Decoene C, Bordet R, et al. A single endotoxin injection in the rabbit causes prolonged blood vessel dysfunction and a procoagulant state. *Crit Care Med* 2000; 28(11):3672-8.
81. Mutunga M, Fulton B, Bullock R, Batchelor A, Gascoigne A, Gillespie JL, et al. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(1): 195-200.
82. Polunovsky VA, Wendt CH, Ingbar DH, Peterson MS, Bitterman PB. Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res* 1994; 214(2):584-94.
83. Messmer UK, Briner VA, Pfeilschifter J. Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 1999; 55(6):2322-37.

84. Stefanec T. Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* 2000;117(3):841-54.
85. Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 1997; 89(7):2429-42.
86. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007; 21(3):157-71.
87. Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ, et al. Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med* 2005;33(11):2540-6.
88. Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 1999; 341(8):586-92.
89. Regoeczi E, Brain MC. Organ distribution of fibrin in disseminated intravascular coagulation. *Br J Haematol* 1969; 17(1):73-81.
90. Salzman AL, Wang H, Wollert PS, Vandermeer TJ, Compton CC, Denenberg AG, et al. Endotoxin-induced ileal mucosal hyperpermeability in pigs: role of tissue acidosis. *Am J Physiol* 1994; 266(4 Pt 1):G633-46.
91. Wiel E, Pu Q, Corseaux D, Robin E, Bordet R, Lund N, et al. Effect of L-arginine on endothelial injury and hemostasis in rabbit endotoxin shock. *J Appl Physiol* 2000; 89(5): 1811-8.
92. Wiel E, Pu Q, Leclerc J, Corseaux D, Bordet R, Lund N, et al. Effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril on endothelial injury and hemostasis in rabbit endotoxic shock. *Intensive Care Med* 2004; 30(8):1652-9.

93. Zhou M, Wang P, Chaudry IH. Endothelial nitric oxide synthase is downregulated during hyperdynamic sepsis. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1335(1-2):182-90.
94. Leclerc J, Pu Q, Corseaux D, Haddad E, Decoene C, Bordet R, et al. A single endotoxin injection in the rabbit causes prolonged blood vessel dysfunction and a procoagulant state. *Crit Care Med* 2000; 28(11):3672-8.
95. Bhagat K, Collier J, Vallance P. Local venous responses to endotoxin in humans. *Circulation* 1996; 94(3):490-7.
96. Bhagat K, Moss R, Collier J, Vallance P. Endothelial “stunning” following a brief exposure to endotoxin: a mechanism to link infection and infarction? *Cardiovasc Res* 1996; 32(5): 822—9.
97. Jourdain M, Tournoy A, Leroy X, Mangalaboyi J, Fourrier F, Goudemand J, et al. Effects of N omega-nitro-L-arginine methyl ester on the endotoxin-induced disseminated intra-vascular coagulation in porcine septic shock. *Crit Care Med* 1997; 25(3):452-9.
98. Walker TA, Curtis SE, King-VanVlack CE, Chapler CK, Vallet B, Cain SM. Effects of nitric oxide synthase inhibition on regional hemodynamics and oxygen transport in endotoxic dogs. *Shock* 1995; 4(6):415-20.
99. Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102:1000-6.

100. Cleland SJ, Sattar N, Petrie JR, Forouhi NG, Elliott HL, Connell JM. Endothelial dysfunction as a possible link between C-reactive protein levels and cardiovascular disease. *Clin Sci* 2000; 98(5):531-5.
101. Hingorani AD, Cross J, Kharbanda RK, Mullen MJ, Bhagat K, Taylor M, et al. Acute systemic inflammation impairs endothelium-dependent dilatation in humans. *Circulation* 2000; 102:994-9.
102. Raza K, Thambyrajah J, Townend JN, Exley AR, Hortas C, Filer A, et al. Suppression of inflammation in primary systemic vasculitis restores vascular endothelial function: lessons for atherosclerotic disease? *Circulation* 2000; 102:1470-2.
103. Miyakazi H, Matsuoka H, Itabe H, Usui M, Ueda S, Okuda S, et al. Hemodialysis impairs endothelial function via oxidative stress. *Circulation* 2000; 101:1002-6.
104. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002;105:546–549.
105. Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, et al. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15:1652–1659.
106. Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, et al. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of camp-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol*. 1994; 267:C1405-C1413.
107. de Graaf JC, Banga JD, Moncada S, et al. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation*. 1992; 85:2284–2290.

108. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager, Just H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation* 1991; 84:1984-92.
109. Wever RM, Luscher TF, Cosentino F, Rabelink TJ. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 1998; 97:108-12.
110. Werns SW, Walton JA, Hsia HH, Nabel EG, Sanz ML, Pitt B. Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease. *Circulation* 1989; 79:287-91.
111. Fathi R, Haluska B, Isbel N, Short L, Marwick TH. The relative importance of vascular structure and function in predicting cardiovascular events. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:616-23.
112. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340:1111-5.
113. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Eng J Med* 1999; 340:115-26.
114. Ross R. Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy. *Transplant Proc* 1993; 25:2041-3.
115. Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101:1899-906.

116. Wang J, Brown MA, Tam SH, et al. Effects of diet on measurements of nitric oxide metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 24:418-20.
117. Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial function. *Ann Med* 2000;32:293-304.
118. Huggins GS, Pasternak RC, Alpert NM, et al. Effect of short term treatment of hyperlipidemia on coronary vasodilator function and myocardial perfusion in regions having substantial impairment of baseline dilator reserve. *Circulation* 1998; 98:1291-6.
119. Honing ML, Smits P, Morrison PJ, Rabelink TJ. Bradykinin-induced vasodilation of human forearm resistance vessels is primarily mediated by endothelium-dependent hyperpolarization. *Hypertension* 2000; 35:1314-8.
120. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288:373–376.
121. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res*. 1996; 79:984–991.
122. Schretzenmayer A. Über Kreislaufregulatorische Vorgänge an den grossen Arterien bei der Muskelarbeit. *Pflügers Arch* 1933; 232: 743–8.
123. Mullen MJ, Kharbanda RK, Cross J, Donald AE, Taylor M, Vallance P, et al. Heterogenous nature of flow-mediated dilatation in human conduit arteries in vivo. *Circ Res* 2001; 88: 145–51.

124. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, and Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399: 601–605.
125. Coretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:257-65.
126. Vogel RA. Measurement of endothelial function by brachial artery flow-mediated vasodilation. *Am J Cardiol* 2001;88:31-4E.
127. Berry KL, Skyrme-Jones RA, Meredith IT. Occlusion cuff position is an important determinant of the time course and magnitude of human brachial artery flow-mediated dilation. *Clin Sci* 2000; 99:261-7.
128. Pálincás A, Tóth E, Venneri L, Rigo F, Csanády M, Picano E. Temporal heterogeneity of endothelium-dependent and –independent dilatation of brachial artery in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiovasc Imaging* 2002; 18:337-42.
129. Donald AE, Charakida M, Falaschetti E, Lawlor DA, Halcox JP, Golding J, et al. Determinants of vascular phenotype in a large childhood population: the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Eur Heart J* 2010; 31:1502-10.
130. Arrebola-Moreno AL, Laclaustra M, Kaski JC. Evaluación no invasiva de la función endotelial en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol* 2012; 65:80-90.

131. Halcox JPJ, Donald AE, Ellins E, Witte DR, Shipley MJ, Brunner EJ, et al. Endothelial function predicts progression of carotid intima-media thickness. *Circulation* 2009; 119:1005-12.
132. Gokce N, Keaney Jr JF, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, et al. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:1769-75.
133. Karatzis EN, Ikonomidis I, Vamvakou GD, Papaioannou TG, Protogerou AD, Andreadou I, et al. Long-term prognostic role of flow-mediated dilatation of the brachial artery after acute coronary syndromes without ST elevation. *Am J Cardiol* 2006; 98:1424-8.
134. Enderle MD, Schroeder S, Ossen R, Meisner C, Baumbach A, Haering H, et al. Comparison of peripheral endothelial dysfunction and intimal media thickness in patients with suspected coronary artery disease. *Heart* 1998; 80(4):349-54.
135. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Rand WM, Udelson JE, et al. Peripheral vascular endothelial function testing as noninvasive indicator of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38(7):1843-9.
136. Fontcuberta J, editor. *Eco-Doppler vascular*. 1ª ed. Madrid: J. Fontcuberta; 2010.
137. EPIDAT: Análisis Epidemiológico de Datos. Epidat 4.1. Servizo de Epidemioloxía de la Dirección Xeral de Innovación e Xestión da Saúde Pública de la Consellería de Sanidade (Xunta de Galicia). [Citado 2015, 6

de junio]. Disponible en:

http://www.sergas.es/MostrarContidos_N3_T01.aspx?IdPaxina=62713

138. Lee MM, Schuessler GB, Chien S. Time-dependent effects of endotoxin on the ultrastructure of aortic endothelium. *Artery* 1988; 15(2):71-89.
139. Russo G, Leopold JA, Loscalzo J. Vasoactive substances: Nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Vascular Pharmacology* 2002; 38: 259-69.
140. Sheeran P, Hall GM. Cytokines in anaesthesia. *Br J Anaesth* 1997; 78:201-19.
141. Helmy SAK, Wahby MAM, El-Nawaway M. The effect of anaesthesia and surgery on plasma cytokine production. *Anaesthesia* 1999; 54: 733-8.
142. Gomes V, Gomes MB, Tibirica E, Lessa MA. Post-operative endothelial dysfunction assessment using laser Doppler perfusión measurement in cardiac surgery patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 2014; 4:468-77.
143. Donald AE, Charakida M, Cole TJ, Friberg P, Chowienczyk PJ, Millasseau SC, et al. Non-invasive assessment of endothelial function. Which Technique? *J Am Coll Cardiol* 2006; 48(9):1846-50.
144. Gokce N, Keaney JF, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function. A prospective study. *Circulation* 2002; 105:1567-72.

145. Unal O, Karatepe O, Ugurlucan M, Koc B, Filizcan U, Aksoy M.
Effects of lower extremity revascularization on the endothelial functions
measured with noninvasive brachial artery flow-mediated dilatation. *Ann
Vasc Surg* 2011; 25(7):969-74.
146. Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-mediated
vasodilation: a diagnostic instrument or an experimental tool? *Chest*
2005; 127:2254-63.
147. Fleiss, J. L.: *The Design and Analysis of Clinical Experiments*.
Wiley, New York – Chichester – Brisbane – Toronto – Singapore 1986,
432 páginas.
148. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D,
Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound
assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the
brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity
Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39(2):257-65.
149. Faulx MD, Wright AT, Hoit BD. Detection of endothelial
dysfunction with brachial artery ultrasound scanning. *Am Heart J* 2003;
145(6):943-51.
150. Lin E, Lowry SF. The human response to endotoxin. *Sepsis*
1998;2:255-62.
151. Lin E, Lowry SF. Inflammatory cytokines in major surgery: a
functional perspective. *Intensive Care Med* 1999;25:255-7.
152. Ziegenfuss T, Wanner GA, Grass C, Bauer I, Schüder G,
Kleinschmidt S, et al. Mixed agonistic-antagonistic cytokine response in

- whole blood from patients undergoing abdominal aortic aneurysm repair. Intensive Care Med 1999;25:279-87.
153. Bienvenu J, Guillaume M, Fabien N, Revillard JP. The clinical usefulness of the measurement of cytokines. Clin Chem Lab Med 2000;38:267-285.
154. Stenken JA, Poschenrieder AJ. Bioanalytical chemistry of cytokines- A review. Analytica Chimica Acta 2015, 853:95-115.
155. Miki C, Iriyama K, Gunson BK, Mayer AD, Buckels JA, McMaster P. Influence of intraoperative blood loss on plasma levels of cytokines and endotoxin and subsequent graft liver function. Arch Surg 1997;132:136-41.
156. Modi S, Malik A, Shahid M. Study of complement activation, C3 and interleukin-6 levels in burn patients and their role as prognostic markers. Indian J Med Microbiol 2014;32:137-42.
157. Yeh FL, Lin WL, Shen HD, Fang RH. Changes in circulating levels of interleukin 6 in burned patients. Burns 1999;25:131-6.
158. Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, Wöfl G, Maurer G, Weidinger F. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. Am J Cardiol 2000; 86(2):207-10.
159. Modena MG, Bonetti L, Coppi F, Bursi F, Rossi R. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. J Am Coll Cardiol 2002; 40:505-10.

160. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001; 104:191-6.
161. Mueisan MI, Salvetti M, Paini A, Monteduro C, Galbassini G, Poisa P, et al. Prognostic role of flow-mediated dilatation of the brachial artery in hypertensive patients. *J Hypertens* 2008; 26(8):1612-8.
162. Masaaki I, Losordo DW. Statins and the endothelium. *Vascul Pharmacol* 2007; 46(1):1-9.
163. Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Moniotte S, Balligand JL, Feron O. Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Circ Res* 2001; 89:866-73.
164. Cheadle WC, Hershman MJ, Wellhausen SR, Polk HC. HLA-DR antigen expression on peripheral blood monocytes correlates with surgical infection. *Am J Surg* 1991; 161(6):639-45.
165. Ditschkowski M, Kreuzfelder E, Rebmann V, Ferencik S, Majetschak M, Schmid EN. HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma. *Ann Surg* 1999; 229(2):246-54.
166. Ryh  aunen P, Surcel HM, Ilonen J. Decreased expression of class II major histocompatibility complex (MHC) molecules on monocytes is found in open-heart surgery related immunosuppression. *Acta Anaesthesiol Scand* 1991; 35:453-6.
167. Klava A, Windsor A, Boylston AW, Reynolds JV, Ramsden CW, Guillou PJ. Monocyte activation after open and laparoscopic surgery. *Br J Surg* 1997; 84(8):1152-6.

168. McBride WT, Armstrong MA, Crockard AD, McMurray TJ, Rea JM. Cytokine balance and immunosuppressive changes at cardiac surgery: contrasting response between patients and isolated CPB circuits. *Br J Anaesth* 1995; 75(6):724-33.
169. Ayala A, Perrin MM, Chaudry IH. Defective macrophage antigen presentation following haemorrhage is associated with the loss of MHC class II (Ia) antigens. *Immunology* 1990; 70(1):33-9.

ANEXO A: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

**TÍTULO DEL ESTUDIO: ESTUDIO DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL ASOCIADA
A LA INFLAMACIÓN POST-QUIRÚRGICA**

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. José Gil Sales.

CENTRO: Servicio de Angiología, Cirugía Vascular y Endovascular, Hospital “Virgen de la Salud”, Toledo. Av. Barber, 30. 45004. Toledo.

INTRODUCCIÓN

Se le ha propuesto que participe voluntariamente en un estudio de investigación. El médico que realiza el estudio en su centro (investigador) ha determinado que cumple usted los requisitos iniciales para entrar en el estudio. Pero antes de que dé su consentimiento para participar en el estudio, debe entender en qué consiste su participación. En este documento (de información para el paciente) se describen la finalidad, los procedimientos, los posibles efectos beneficiosos y riesgos.

Léalo atentamente y no dude en ponerse en contacto con su médico para cualquier duda que tenga sobre el estudio y/o sobre la información que se facilita a continuación. Éste le aclarará cualquier pregunta que pueda surgir acerca de este estudio.

Muchas gracias por su colaboración.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

Usted va a someterse a una intervención quirúrgica. El objetivo de este estudio es demostrar que existe un proceso inflamatorio que se asocia a la cirugía y altera la capa más interna de sus vasos (llamado endotelio). Este fenómeno es cuantificable y su conocimiento permitirá aumentar nuestros conocimientos con respecto al fenómeno de la curación en los pacientes como usted, intervenidos quirúrgicamente. Concretamente se le va a someter a dos tipos de prueba diagnósticas diferentes para valorar el estado de funcionamiento de dicho endotelio o capa más interna de las arterias y analizar la cantidad de citoquinas (sustancias con importante papel en la inflamación) a lo largo de tres etapas: antes de operarse, 6 horas tras la operación y 24 horas tras la intervención, a fin de conocer como se comporta el funcionamiento interno de su circulación y controlar de que manera le afecta someterse a una operación quirúrgica. Una de las pruebas consiste en realizar una ecografía de su brazo para medir el tamaño de su arteria humeral antes y después de hinchar durante 5 minutos un manguito de presión. Es una prueba similar a la toma de tensión arterial que le habrán realizado repetidamente y con una duración aproximada de la prueba de 7 minutos. Esta prueba es inocua para usted y no conlleva ningún riesgo más allá del que puede representar su traslado al Laboratorio de Vascular, lugar donde se realizará la prueba.

La otra prueba consiste en una extracción de sangre venosa (una analítica) para poder medir la cantidad de citoquinas en la sangre. En los casos en que sea posible, se aprovecharán las punciones que se realizan para su control analítico y así obtener un tubo pequeño más de sangre para dicho estudio. Los riesgos de esta técnica son los conocidos de una punción: hematoma en la zona de extracción, dolor con el pinchazo.

Como se le ha comentado, ambas pruebas se repetirán en 3 ocasiones durante su ingreso en nuestro centro.

¿CUÁNTOS PACIENTES PARTICIPARÁN EN EL ESTUDIO?

Participarán en este estudio aproximadamente 40 pacientes del mismo centro que el suyo.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO:

Este estudio pretende mejorar en el futuro la asistencia y la calidad del proceso de curación en los pacientes intervenidos. Se plantea analizar la importancia del endotelio (capa más interna de los vasos) en los procesos asociados a una intervención quirúrgica con el fin de mejorar, en el futuro, el campo de la medicina encargada de controlar y disminuir los riesgos asociados a una operación como a la que usted se va a someter. Es posible que usted no obtenga ningún beneficio individual tras la realización del estudio, pero tampoco representa ningún riesgo para usted más allá de los descritos en el apartado anterior como consecuencia de la realización de las pruebas.

CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse al médico responsable del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y únicamente el médico encargado del estudio y sus colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando

la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

PARTICIPACIÓN / ABANDONO VOLUNTARIO

Su participación en este estudio es voluntaria. Dispone de total libertad para rechazar el ofrecimiento de participar y para retirarse del estudio en todo momento. Su decisión de participar o no participar no afectará en modo alguno a su tratamiento actual o futuro. Contará con tiempo y ocasiones suficientes para realizar las preguntas que desee acerca de los detalles del estudio y para decidir si quiere participar.

Una vez iniciado el estudio, si decide retirarse del mismo, es suficiente con que hable con el investigador. Mantendrá el derecho de rehusar a participar en la recogida de los datos y puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

Estudio: **ESTUDIO DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL ASOCIADA A LA INFLAMACIÓN POST-QUIRÚRGICA.**

Yo (nombre y apellidos)

.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

El **Dr. Jose Gil Sales** o en su defecto con el Dr.

.....

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Firma del paciente:

Firma del investigador:

Nombre (en mayúsculas):

Nombre (en mayúsculas):

Fecha:

Fecha

Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente

CONSENTIMIENTO INFORMADO ORAL ANTE

TESTIGOS

Estudio: **ESTUDIO DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL ASOCIADA A LA INFLAMACIÓN POST-QUIRÚRGICA**

Yo..... (nombre y apellidos del testigo)
declaro bajo mi responsabilidad que
(nombre y apellidos del participante)

Ha leído (ó se le ha leído, en el caso en que el paciente no pueda leer), la hoja de información que se le ha entregado.

Ha podido hacer preguntas sobre el estudio.

Ha recibido suficiente información sobre el estudio.

Ha hablado con: el **Dr. Jose Gil Sales** o en su defecto con el Dr

..... (nombre del investigador)

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirarse del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

- Ha expresado libremente su conformidad para participar en el estudio en este estudio y para el acceso y utilización de los datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Firma del testigo:

Firma del investigador:

Nombre:

Nombre:

Fecha:

Fecha:

Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente

ANEXO B: DOCUMENTO DE APROBACIÓN POR PARTE DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA (CEIC).

COMPLEJO HOSPITALARIO DE TOLEDO
HOSPITAL VIRGEN DE LA SALUD
Avda. Barber, 30. 45004. Toledo. Teléfono 925 269200

C.E.I.C. SALIDA

FECHA	15/04/11
N.º	86



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA


Doña Enriqueta Muñoz Platón, Secretaria del Comité Ético de Investigación clínica del "Complejo Hospitalario de Toledo".

CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado el Proyecto de Investigación: **"ESTUDIO DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL ASOCIADA A LA INFLAMACIÓN POST-QUIRÚRGICA"**. Investigador principal: **Dr. Jose Gil Sales**. Servicio de Cirugía Vascular, y considera que:

El CEIC aprueba este Proyecto.

Lo que firmo en Toledo, 14 de julio de 2011.


COMPLEJO HOSPITALARIO DE TOLEDO
COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA
Fdo: Enriqueta Muñoz Platón

ANEXO C: INFORME DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN.

COMPLEJO HOSPITALARIO DE TOLEDO
HOSPITAL VIRGEN DE LA SALUD
Avda. Barber, 30. 45004. Toledo. Teléfono 925 269200



INFORME DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN DEL "COMPLEJO HOSPITALARIO DE TOLEDO"

La Comisión de Investigación del Complejo Hospitalario de Toledo ha evaluado el Proyecto de Investigación:

Título: ***"Estudio de la disfunción endotelial asociada a la inflamación post-quirúrgica."***

Investigador principal: ***Dr. Jose Gil Sales.***

La Comisión de Investigación considera que el proyecto evaluado tiene objetivos científicamente relevantes, arrojará resultados válidos y con utilidad práctica y, con los medios disponibles más los solicitados, es viable. Asimismo, considera que el equipo investigador tiene capacidad para llevar a buen fin el citado proyecto.

Toledo, 2 de septiembre de 2011.

Fdo. Raúl Borrego Domínguez.
Secretario de la Comisión de Investigación
del Complejo Hospitalario de Toledo